



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade de Lisboa**

# **PRODUÇÃO DE AZEITONA DE MESA AO NATURAL FERMENTADA POR ESTIRPES DE BACTÉRIAS LÁCTICAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS**

**Liliana de Pinho Pinhal Ferraz Moreira**

Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador: Doutora Cidália de Fátima Louro Morgado Peres

Co- orientador: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins

## **Júri:**

Presidente: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Cidália de Fátima Louro Morgado Peres, Investigadora Principal do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.;

Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Lisboa, 2013

## Agradecimentos

É com grande apreço que expresso os meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em particular:

À Doutora Cidália Peres, minha orientadora, por me ter proporcionado a oportunidade de integrar a sua equipa de trabalho, pelo apoio, incentivo e disponibilidade, lutando sempre por este projecto, mesmo nos momentos mais difíceis. A sua amizade e a transmissão de todos os seus conhecimentos científicos foram imprescindíveis para a execução deste trabalho.

À Doutora Margarida Moldão, minha co-orientadora, pelo constante apoio e esclarecimentos prestados durante a execução deste trabalho. A sua orientação e rigor científico foram essenciais para a concretização deste trabalho.

A toda a equipa do *Food Microbial Technology Laboratory* do ITQB, nomeadamente à Dr.<sup>a</sup> Cátia Peres, Dr.<sup>a</sup> Marta Alves, Dr.<sup>a</sup> Maria José Carvalho, Dr.<sup>a</sup> Joana Maricato, Dr.<sup>a</sup> Clénira Varela e ao Doutor Adrian Hernandez-Mendonza pela disponibilidade e apoio na execução de todo o trabalho experimental, mas sobretudo pela enorme amizade e companheirismo. O seu apoio foi irrefutavelmente decisivo!

À equipa da Unidade de Ciência e Tecnologia Alimentar, Oeiras, do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP, que integrou o Painel de Provadores de Azeitona de Mesa, que tão gentilmente aceitou colaborar neste estudo, nomeadamente ao Eng.<sup>o</sup> Luís Catulo pela sua disponibilidade e amizade.

Às técnicas de laboratório do Departamento de Ciências e Tecnologia dos Alimentos do Instituto Superior de Agronomia, nomeadamente D.<sup>a</sup> Júlia e D.<sup>a</sup> Graziela pela importante ajuda, amizade e conhecimentos transmitidos durante a realização das análises químicas.

Aos meus pais que sempre me apoiaram incondicionalmente ao longo de todo o meu percurso, académico e pessoal, estando presentes em qualquer situação.

Ao Diogo Matos Oliveira pelo constante incentivo, carinho e apoio nos momentos de desânimo. Obrigada pela paciência e confiança em mim demonstrada.

Finalmente, a todos aqueles que não estão aqui mencionados, mas que de alguma forma me ajudaram a alcançar este objectivo na minha vida!

**A todos, um profundo e sincero OBRIGADA!**

## RESUMO

Com o objectivo de contribuir para o desenvolvimento de azeitona (*Galega vulgar*) fermentada ao natural, potencialmente probiótica, efectuou-se o estudo *in vitro* das propriedades probióticas de 3 estirpes de *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillus pentosus* B96, *Lactobacillus plantarum* 614 e *Lactobacillus paraplantarum* A1) isoladas de azeitona ao natural. Após verificar que estas estirpes apresentam aptidão probiótica, foram adicionadas às salmouras de fermentação (escala piloto) de azeitona ao natural, actuando como culturas adjuntas, e os resultados sugerem que possuem propriedades tecnológicas promissoras. No final da fermentação inferiu-se quanto às suas taxas de implementação no processo, através de métodos moleculares, e verificou-se que a estirpe *L. pentosus* B96 apresentou os melhores resultados. A análise sensorial aos frutos permitiu concluir que a adição da estirpe *L. pentosus* B96 e *L. paraplantarum* A1 manteve as boas características organolépticas no produto. A azeitona ao natural potencialmente probiótica foi conservada em diferentes modalidades de embalagem (vácuo e salmoura) e temperaturas de armazenamento (4 e 22 °C) e foi avaliada para os parâmetros microbiológicos, físico-químicos e organolépticos. Ao fim de 90 dias, o produto registou a quantidade mínima de bactérias lácticas exigida pela FAO/WHO para um alimento probiótico ( $10^6$  ufc/g) quando armazenado a 22 °C, independentemente da modalidade de embalagem. Este estudo sugere que a azeitona ao natural, poderá constituir um veículo biológico eficiente para administração de probióticos, quando embalada em salmoura e conservada à temperatura ambiente.

**Palavras-chave:** azeitona de mesa, fermentação, bactérias lácticas, probióticos

## ABSTRACT

With the aim to contribute for the development of potential probiotic naturally fermented table olives (*Galega vulgar* cv.) the study of *in vitro* probiotic properties of 3 *Lactobacillus* spp. strains (*Lactobacillus pentosus* B96, *Lactobacillus plantarum* 614 e *Lactobacillus paraplantarum* A1) isolated from naturally fermented olives was made. After verifying that these strains has potential probiotic ability, they were introduced into the brines at the onset of table olive fermentation (pilot scale), acting as adjunct cultures, and the results showed good technological properties too. Molecular techniques were used to detect the survival rate of the potential probiotic strains in the final fermented product and the strain *Lactobacillus pentosus* B96 showed the best results. The sensory analysis revealed that the addition of the strains *L. pentosus* B96 and *L. paraplantarum* A1 did not altered the organoleptic characteristics of the product. The fruits fermented with the potential probiotic strains were packaged under different packaging systems (vacuum and brine) and storage conditions (4 °C and 22 °C) and microbiological, physicochemical and organoleptic parameters were studied. After 90 days of storage the results showed that the lactic acid bacteria were present in satisfactory amounts required by FAO/WHO for probiotic food ( $10^6$  cfu/g) at 22 °C at both vacuum and brine pouches. Based on the mentioned results it is possible to conclude that the naturally fermented table olives, might be an efficient vehicle for the administration of probiotics when packed in brine and in a non-refrigerated storage conditions.

**Keywords:** table-olives, fermentation, lactic acid bacteria, probiotics

## EXTENDED ABSTRACT

Probiotic bacteria are generally available for consumers as powder concentrate preparations or incorporated in milk-based foods. Due to the increase of market awareness for probiotic foods and the consequent industry demand for innovations, a new kind of probiotic food has been developed using table olives as a carrier.

The present study aims to evaluate the probiotic potential of *Lactobacillus* spp. strains isolated from naturally fermented (Greek style) table olives (*Galega vulgar* cultivar) and use these strains as adjunct cultures for the improvement of the traditional fermentation process and the development of a functional food. Thus, 3 *Lactobacillus* spp. strains (*Lactobacillus pentosus* B96, *Lactobacillus plantarum* 614 e *Lactobacillus paraplantarum* A1) isolated from naturally table olives were screened for their probiotic potential. *L. casei* Shirota was used as the reference strain. Results showed good survival rate after digesting process. All strains exhibited auto- (ca. 4-8 %) and co-aggregation ( $\geq 30\%$  depending of the pathogen), hydrophobicity (ca. 10 - 25 %) and adhesion to Caco-2 cells (ca. 0.8 – 3.9%), while none of the strains showed hemolytic capacity or the ability to hydrolyze mucin. Additionally, they exhibited an antimicrobial activity against pathogens and intrinsic antibiotic resistance. Hence, the 3-selected strains have a potential probiotic value. However, further *in vitro* and *in vivo* studies are required to assess their usefulness as probiotic cultures in the manufacture of new probiotic products. The technological characteristics and the dominance in brines of the selected potential probiotic *Lactobacillus* spp. strains during table olive naturally fermentations were studied. When compared with the spontaneous process (control), the use of these microorganisms as adjunct cultures led to higher lactic acid bacteria than yeast populations, an absence in *Enterobacteriaceae* population and a faster acidification of the brines. These results indicated that the strains had promising technological characteristics. Molecular techniques were used to detect the survival rate of the potential probiotic strains in the final fermented product and the strain *L. pentosus* B96 showed the best results. The sensory analysis revealed that the addition of the strains *L. pentosus* B96 and *L. paraplantarum* A1 did not altered the organoleptic characteristics of the final product. After this the fruits fermented with the potential probiotic strains were packaged under different packaging systems (vaccum and brine pouches) and storage conditions (4 °C and 22 °C) and microbiological, physicochemical and organoleptic parameters were studied. After 90 days of storage the results showed that the LAB were present in satisfactory amounts ( $10^6$  cfu/g) at 22 °C at both vaccum and brine pouches ( $p > 0,05$ ). Also, the storage temperature had significant influence ( $p < 0,05$ ) in the pH and in the total acidity. Regarding the sensory attributes and the purchase intent, the product packed in brine pouches had the higher scores. Based on the mentioned results it is possible to conclude that a fermented vegetable food matrix, such as fermented olives, might be an efficient vehicle for the administration of probiotics in a tasty, non-refrigerated functional product which already has a great nutritional value by itself.

## ÍNDICE

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	ii
Abstract .....	iii
Extended abstract .....	iv
Índice .....	v
Lista de tabelas .....	viii
Lista de figuras .....	ix
Lista de abreviaturas e siglas .....	xii
I - INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS .....	1
II - ENQUADRAMENTO TEÓRICO .....	4
1 AZEITONA DE MESA	
1.1 O sector da azeitona de mesa a nível mundial e europeu .....	4
1.2 Património Olivícola Nacional .....	5
1.3 Tipos de processamento .....	8
1.4 Fermentação .....	12
1.4.1 Aspectos microbiológicos .....	12
1.4.2 Aspectos físico-químicos .....	15
2 AZEITONA PROBIÓTICA – UM NOVO ALIMENTO FUNCIONAL	
2.1 Definição e justificação .....	17
2.2 Critérios de selecção de novas estirpes probióticas e utilização das mesmas como culturas adjuntas na fermentação de azeitona .....	20
III - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	
3 Avaliação <i>in vitro</i> de parâmetros probióticos de estirpes de <i>Lactobacillus</i> spp. isoladas de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural .....	23
3.1 Material biológico e condições de cultura .....	23
3.2 Metodologias analíticas .....	24
3.2.1 Critérios de selecção de estirpes probióticas relativos à segurança .....	24
3.2.1.1 Avaliação da patogenicidade .....	24

3.2.1.2 Avaliação da resistência a antibióticos .....	25
3.2.2 Critérios de selecção de estirpes probióticas relativos à funcionalidade ..	26
3.2.2.1 Resistência ao processo digestivo simulado .....	26
3.2.2.2 Avaliação da capacidade de colonização e aderência ao epitélio intestinal .....	29
3.2.2.3 Avaliação da actividade antagonista contra bactérias patogénicas ....	31
3.2.3 Análise estatística dos resultados .....	32
3.3 Resultados e discussão .....	33
3.3.1 Critérios de selecção de estirpes probióticas relativos à segurança .....	33
3.3.1.1 Avaliação da patogenicidade .....	33
3.3.1.2 Avaliação da resistência a antibióticos .....	35
3.3.2 Critérios de selecção de estirpes probióticas relativos à funcionalidade ..	36
3.3.2.1 Resistência ao processo digestivo simulado .....	38
3.3.2.2 Avaliação da capacidade de colonização e aderência ao epitélio intestinal .....	38
3.3.2.3 Avaliação da actividade antagonista contra bactérias patogénicas ....	42
3.4 Balanço intercalar .....	44
4 Preparação de azeitona (cv. Galega vulgar) ao natural com adição de culturas adjuntas de <i>Lactobacillus</i> spp. potencialmente probióticas .....	45
4.1 Material biológico .....	45
4.1.1 Material vegetal .....	45
4.1.2 Culturas de <i>Lactobacillus</i> spp. com potencial probiótico .....	45
4.2 Delineamento experimental .....	45
4.3 Controlo analítico da salmoura de fermentação .....	46
4.3.1 Análises microbiológicas .....	46
4.3.2 Análises físico-químicas .....	47
4.4 Caracterização genotípica de bactérias lácticas isoladas da salmoura de fermentação .....	48
4.5 Análise sensorial de azeitona .....	49
4.6 Análise estatística dos resultados .....	50

4.7 Resultados e discussão .....	51
4.7.1 Perfil microbiano da fermentação de azeitona .....	51
4.7.2 Perfil físico-químico da fermentação de azeitona .....	53
4.7.3 Caracterização genotípica de bactérias lácticas isoladas da salmoura de fermentação .....	55
4.7.4 Análise sensorial de azeitona .....	56
4.8 Balanço intercalar .....	57
5 Estudo do efeito da embalagem e temperatura de conservação na qualidade de azeitona (cv. Galega vulgar) ao natural com adição de culturas adjuntas de <i>Lactobacillus</i> spp. potencialmente probióticas .....	58
5.1 Material vegetal .....	58
5.2 Material de embalagem .....	58
5.3 Delineamento experimental .....	58
5.4 Controlo analítico de azeitona ao natural embalada sob vácuo e em salmoura e conservada a 4 °C e 22 °C .....	59
5.4.1 Análises microbiológicas .....	59
5.4.2 Análises físico-químicas .....	60
5.4.3 Análise sensorial de azeitona .....	61
5.4.4 Análise estatística dos resultados .....	62
5.5 Resultados e discussão .....	63
5.5.1 Análises microbiológicas de azeitona ao natural embalada sob vácuo e em salmoura e conservada a 4 °C e 22 °C .....	63
5.5.2 Análises físico-químicas de azeitona ao natural embalada sob vácuo e em salmoura e conservada a 4 °C e 22 °C .....	66
5.5.3 Análise multivariada dos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e sensoriais de azeitona ao natural, embalada sob vácuo e em salmoura no final de 90 dias de conservação a 4 °C e 22 °C .....	68
IV – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	70
V – BIBLIOGRAFIA .....	72
VI - ANEXO	



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Principais benefícios para a saúde dos alimentos probióticos .....	18
<b>Tabela 2</b> Valores de CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) de antibióticos para as estirpes de <i>Lactobacillus</i> spp. isoladas de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural .....	26
<b>Tabela 3</b> Viabilidade celular ( $\log \text{ufc/mL}$ ) das estirpes de <i>Lactobacillus</i> spp. isoladas de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural nas diferentes etapas do processo digestivo simulado <i>in vitro</i> .....	27
<b>Tabela 4</b> Actividade antagonista dos sobrenadantes de estirpes de <i>Lactobacillus</i> spp. isoladas de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural contra bactérias patogénicas ....	43
<b>Tabela 5</b> Sobrevivência (%) de bactérias patogénicas na presença dos sobrenadantes de estirpes de <i>Lactobacillus</i> spp. isoladas de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural com e sem proteinase K .....	44
<b>Tabela 6</b> Percentagem de correspondência dos isolados bactérias lácticas da salmoura de fermentação de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural com adição de culturas adjuntas, relativamente à espécie adicionada .....	55
<b>Tabela 7</b> Parâmetros físico-químicos de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural com e sem adição de culturas adjuntas de <i>Lactobacillus</i> spp. potencialmente probióticas, embalada sob vácuo e em salmoura após 90 dias de conservação a 4 °C e 22 °C ...	67

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Principais países produtores de azeitona de mesa. Adaptado a partir de dados do COI correspondentes à campanha 2011/2012 .....	5
<b>Figura 2</b> Evolução da produção e consumo mundial de azeitona de mesa, nos últimos dez anos .....	5
<b>Figura 3</b> Evolução da produção e consumo de azeitona de mesa em Portugal, nos últimos dez anos .....	6
<b>Figura 4</b> Principais regiões produtoras de azeitona de mesa em Portugal (COI, 2012) .....	7
<b>Figura 5</b> Diagrama de processamento dos principais tipos de preparação de azeitona de mesa .....	11
<b>Figura 6</b> Representação esquemática da simulação <i>in vitro</i> do processo digestivo humano .....	28
<b>Figura 7</b> Avaliação da actividade mucolítica .....	34
<b>Figura 8</b> Auto-agregação (%) de estirpes de <i>Lactobacillus</i> spp. isoladas de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural, avaliada ao fim de 2 h .....	39
<b>Figura 9</b> Co-agregação (%) de estirpes de <i>Lactobacillus</i> spp. isoladas de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural com bactérias patogénicas, avaliada ao fim de 4 h .....	40
<b>Figura 10</b> Hidrofobicidade (%) de estirpes de <i>Lactobacillus</i> spp. isoladas de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural .....	41
<b>Figura 11</b> Aderência (%) de estirpes de <i>Lactobacillus</i> spp. isoladas de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural às células Caco-2 .....	42
<b>Figura 12</b> Lote de azeitona da cv. <i>Galega vulgar</i> .....	45
<b>Figura 13</b> Evolução da população de bactérias lácticas (■) e leveduras (●) ao longo do tempo, na salmoura de fermentação de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural com e sem adição de culturas adjuntas de <i>Lactobacillus</i> spp. com potencial probiótico .....	51
<b>Figura 14</b> Evolução do teor de NaCl (% m/v) ao longo do tempo, na salmoura de fermentação de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural com e sem adição de culturas adjuntas de <i>Lactobacillus</i> spp. com potencial probiótico .....	53

<b>Figura 15</b> Evolução do pH ao longo do tempo, na salmoura de fermentação de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural com e sem adição de culturas adjuntas de <i>Lactobacillus</i> spp. com potencial probiótico .....	54
<b>Figura 16</b> Evolução da Acidez total (% m/v) ao longo do tempo, na salmoura de fermentação de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural com e sem adição de culturas adjuntas de <i>Lactobacillus</i> spp. com potencial probiótico .....	55
<b>Figura 17</b> Projecção dos atributos sensoriais (A) e das amostras de azeitona ao natural (B) no plano definido pelas duas primeiras componentes principais .....	58
<b>Figura 18</b> Azeitona embalada sob vácuo .....	60
<b>Figura 19</b> Azeitona embalada em salmoura .....	60
<b>Figura 20</b> Evolução da população de bactérias lácticas (■) e leveduras (●) ao longo do tempo, na salmoura de fermentação de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural com e sem adição de cultura da estirpe <i>Lactobacillus pentosus</i> B96, embalada sob vácuo e em salmoura, e conservada a 4 °C (A) e 22 °C (B) .....	63
<b>Figura 21</b> Evolução da população de bactérias lácticas (■) e leveduras (●) ao longo do tempo, na salmoura de fermentação de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural com adição de cultura da estirpe <i>Lactobacillus plantarum</i> 614, embalada sob vácuo e em salmoura, e conservada a 4 °C (A) e 22 °C (B) .....	64
<b>Figura 22</b> Evolução da população de bactérias lácticas (■) e leveduras (●) ao longo do tempo, na salmoura de fermentação de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural com adição de cultura da estirpe <i>Lactobacillus paraplantarum</i> A1, embalada sob vácuo e em salmoura, e conservada a 4 °C (A) e 22 °C (B) .....	64
<b>Figura 23</b> Evolução da população de bactérias lácticas (■) e leveduras (●) ao longo do tempo, na salmoura de fermentação de azeitona (cv. <i>Galega vulgar</i> ) ao natural com adição de cultura da estirpe <i>Lactobacillus paraplantarum</i> A1, embalada sob vácuo e em salmoura, e conservada a 4 °C (A) e 22 °C (B) .....	65
<b>Figura 24</b> <i>Análise Cluster</i> da análise multivariada a azeitona ao natural (cv. <i>Galega vulgar</i> ) com e sem adição de cultura de <i>Lactobacillus</i> spp. potencialmente probiótica em diferentes modalidades de embalagem e temperatura de conservação. Variáveis microbiológicas, físico-químicas e sensoriais .....	69

<b>Figura 25</b> Projecção dos parâmetros analisados (A) e das amostras de azeitona ao natural (cv. <i>Galega vulgar</i> ) (B) no plano definido pelas duas primeiras componentes principais .....	70
--	----

## **LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS**

**ATCC** - *American Type Culture Collection*

**CMI** - *Concentração Mínima Inibitória*

**COI** - *Conselho Oleícola Internacional*

**EFSA** - *European Food Safety Authority*

**EUCAST** - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

**FEEDAP** - *Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed*

**GRAS** - *Generally Recognized as Safe*

**MRS** - *Man, Rogosa and Sharpe*

**PCR** - *Polimerase Chain Reaction*

**TSB** - *Tryptone Soy Broth*

**VRBD** - *Violet Red Bile Dextrose*

**YGC** - *Yeast Extract Glucose Chloramphenicol*

## I - INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

A azeitona é o fruto da oliveira (*Olea europaea* L.), uma das árvores mais características nos países da bacia mediterrânica, cultivada para a produção de azeite e de azeitona de mesa. A maioria da produção é destinada à obtenção de azeite, sendo que apenas 7% a 10% da produção mundial é consumida como azeitona de mesa (Hutkins, 2006).

Segundo a Norma Portuguesa NP 3034 (2012) e o Conselho Oleícola Internacional (COI), entende-se por “Azeitona de mesa”, o “produto preparado a partir de frutos de variedades apropriadas da espécie *Olea europaea sativa* Hoffg Link, em estado de maturação conveniente, submetidos a tratamentos e operações que assegurem as suas características e boa conservação.” A referida norma define ainda as diferentes preparações comerciais e estabelece as categorias de qualidade apropriadas à semelhança do estabelecido pelo COI.

O sector da azeitona de mesa detém uma grande importância na agricultura europeia, representando uma das principais actividades económicas em muitas regiões produtoras do Mediterrâneo. Contudo, do ponto de vista da produção, o sector encontra-se extremamente fragmentado e caracteriza-se essencialmente por um grande número de pequenas empresas e explorações familiares de pequena dimensão, geralmente com reduzidas margens de lucro e, como tal, particularmente vulneráveis às variações de produção anuais. Os custos de adesão à nova legislação ambiental europeia, impondo regras restritas para o sector agrícola, têm também um impacto expressivo no sector olivícola. Adicionalmente, alguns países produtores emergentes como é o caso da Austrália, podem representar uma séria ameaça para o sector olivícola europeu, nomeadamente da azeitona de mesa. Assim, a sua sobrevivência requererá uma incorporação de novas tecnologias efectuando um controlo dos processos mais eficiente, uma adaptação dos seus produtos às necessidades dos consumidores e, consequentemente, o lançamento de novos produtos.

No mercado europeu observa-se um crescimento cada vez mais acentuado no desenvolvimento de produtos fermentados e funcionais, reflectindo um grande interesse no estudo de alimentos naturais que demonstrem possuir benefícios para a saúde. Estima-se que pelo menos 25% da dieta europeia e 60% da dieta dos países em desenvolvimento seja constituída por alimentos fermentados. Tal deve-se, essencialmente, ao reconhecimento da importância da fermentação na preservação dos alimentos. Contudo, esta possui um papel igualmente relevante na garantia da

segurança alimentar, na melhoria das propriedades sensoriais do produto, bem como no contributo para o desenvolvimento de alimentos importantes para a nutrição e saúde humana (Holzapfel e Wood, 1995; Stiles, 1996; Leroy e DeVuyst, 2004). O mercado dos alimentos funcionais, alimentos que para além das suas propriedades nutritivas providenciam efeitos benéficos para a saúde de quem os consome, é dominado sobretudo pelos alimentos probióticos (Siró *et al.*, 2008). Os alimentos probióticos são habitualmente definidos como “alimentos processados que contêm na sua matriz e em concentrações suficientes, microrganismos viáveis que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos ao hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). Os microrganismos comumente utilizados como culturas probióticas em alimentos funcionais pertencem ao grupo das bactérias lácticas e incluem-se sobretudo nos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Donkor *et al.*, 2007; Gomes e Malcata, 1999).

Nos últimos anos os produtos suplementados com culturas probióticas assumiram um papel relevante no universo científico, propiciando investigações no seu desenvolvimento e efectuadas essencialmente em produtos lácteos fermentados, produtos que actualmente predominam no mercado dos alimentos probióticos (Saad *et al.*, 2011). Desta forma, estes têm vindo a ser usados tradicionalmente como veículo alimentar para bactérias probióticas. No entanto, o aumento do vegetarianismo nos países desenvolvidos despertou um crescente interesse por alimentos probióticos de origem não-láctea. Além disso, a intolerância à lactose e a alergia a proteínas lácteas, são alguns dos grandes inconvenientes relacionados com os produtos lácteos fermentados (Prado *et al.*, 2008; Rizk *et al.*, 1999). A introdução de culturas probióticas em produtos não-lácteos constitui um desafio no segmento dos alimentos funcionais, na medida em que a sua viabilidade na matriz alimentar depende tanto estirpe utilizada, como dos factores intrínsecos e extrínsecos do próprio alimento (Guergoletto *et al.*, 2010). Estudos demonstram que os produtos vegetais fermentados constituem um bom veículo biológico para o desenvolvimento de alimentos probióticos (De Vuyst *et al.*, 2008; Ruiz-Moyano *et al.*, 2008). Neste contexto, a azeitona de mesa possui condições nutritivas e estruturais adequadas, em particular na epiderme do fruto, para a sobrevivência de populações microbianas, nomeadamente de bactérias lácticas (Nychas *et al.*, 2002; Lavermicocca *et al.*, 2005; Valerio *et al.*, 2006). Os estudos efectuados com azeitona fermentada como veículo biológico de estirpes de bactérias lácticas potencialmente probióticas tanto de origem humana, como de origem da própria azeitona demonstraram sucesso na manutenção da sua viabilidade e apropriadas características organolépticas no produto final (Lavermicocca *et al.*, 2005;

Bautista-Gallego *et al.*, 2013; Rodriguez-Gomez *et al.*, 2013). Esta “probióticação” (Yoon *et al.*, 2004) da azeitona aliada às suas propriedades nutricionais equilibradas, incluindo na sua composição substâncias biologicamente activas que modulam processos metabólicos ou fisiológicos (ácidos gordos monoinsaturados, compostos fenólicos, fibras dietéticas, vitaminas e minerais), poderá constituir uma forma de controlar e incrementar a qualidade do processo de fermentação tradicional sem desvirtuar as características a eles intrínsecas, bem como proporcionar benefícios para a saúde do consumidor, posicionando assim a azeitona de mesa entre os novos alimentos funcionais. Como a maioria dos alimentos fermentados a azeitona é, *per se*, microbiologicamente segura devido ao seu elevado teor em ácido láctico resultante do metabolismo das bactérias lácticas. O cloreto de sódio, os compostos fenólicos e outros metabolitos com propriedades inibidoras da microbiota contaminante e patogénica contribuem igualmente para a garantia da segurança alimentar. O presente estudo enquadra-se no âmbito do projecto europeu denominado ‘PROBIOLIVES’ do 7th Framework Program, Research for SME Associations ‘*Table olive fermentation with selected strains of probiotic lactic acid bacteria. Towards a new functional food*’ (GA 24347) que tem como objectivo a produção de um alimento funcional, azeitona de mesa fermentada por bactérias lácticas que possuam características probióticas e em teores adequados à promoção de saúde do consumidor, não alterando a qualidade do produto.

Com a realização deste trabalho pretendeu-se contribuir para o estudo da azeitona de mesa ao natural potencialmente probiótica, posicionando-a entre os novos alimentos funcionais como forma de valorizar e potenciar as características saudáveis deste alimento da dieta mediterrânica. Para conseguir alcançar o objectivo principal foram considerados os seguintes objectivos secundários:

1. Avaliar *in vitro* parâmetros probióticos de estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural;
2. Estudar o efeito da adição de estirpes de *Lactobacillus* spp. com potencial probiótico, actuando como culturas adjuntas, ao processo fermentativo de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural à escala piloto;
3. Estudar o efeito de duas modalidades de embalagem e duas temperaturas de conservação nos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e sensoriais de azeitona potencialmente probiótica, ao longo do tempo de conservação.



## II - ENQUADRAMENTO TEÓRICO

### 1. AZEITONA DE MESA

#### 1.1 O sector da azeitona de mesa a nível mundial e europeu

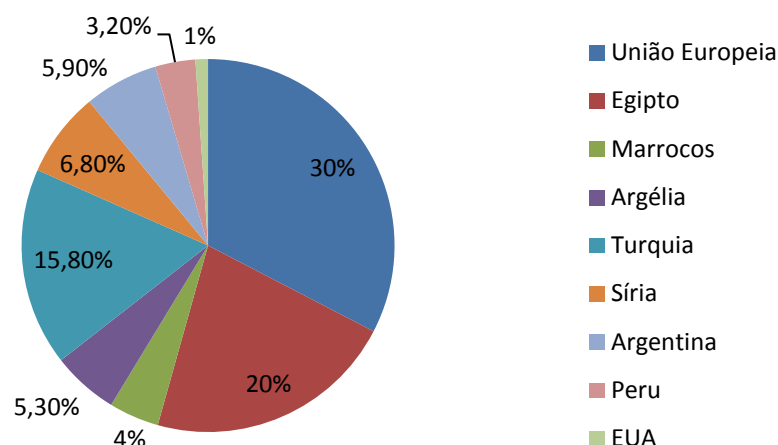
A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das árvores de fruto mais importantes nos países da bacia do Mediterrâneo. Possui uma forte relevância histórica, simbólica e económica constituindo um ícone da agricultura nas regiões produtoras. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação, os dez principais países produtores de azeitona pertencem a esta região. Em Portugal, o sector da olivicultura, tem assumido um papel importante, ocupando aproximadamente 346 000 hectares de olival em todo o continente, com especial incidência nas regiões do Alentejo e Trás-os-Montes (INE, 2011).

A valorização da azeitona reside na importância económica e social do azeite e também na sua utilização como azeitona de mesa onde, devido às suas propriedades organolépticas e à sua composição, é muito apreciada em gastronomia como aperitivo, elemento nutricional ou mesmo elemento decorativo (Fernández-Díez, 1983).

A produção mundial de azeitona ultrapassa os 18 milhões de toneladas por ano, sendo 90 % da produção destinada à obtenção de azeite e 10% à obtenção de azeitona de mesa (COI, 2012).

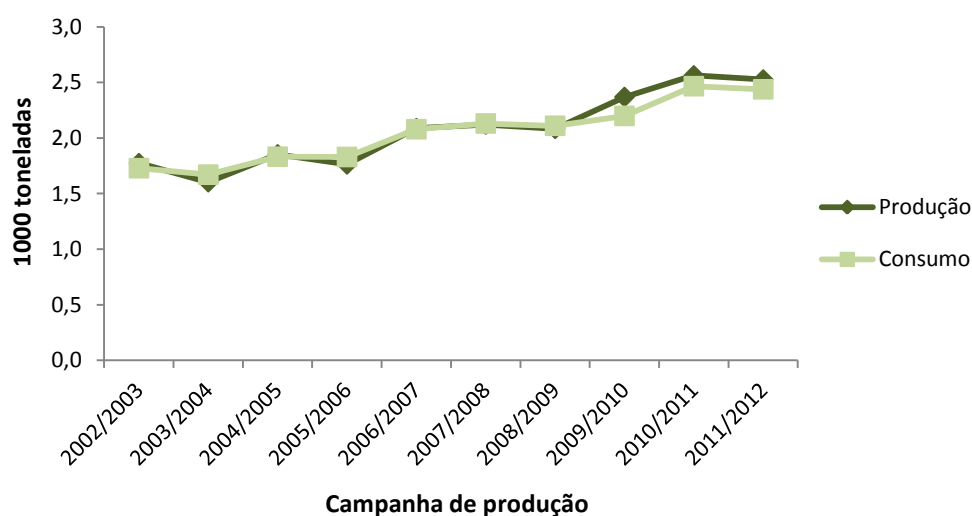
Relativamente à campanha 2011/12 (Fig. 1), a produção mundial de azeitona de mesa ascendeu a 2.526 mil toneladas. Cerca de 30 % deste valor corresponde à União Europeia assumindo-se por essa via, como o principal produtor mundial e exportador para regiões não produtoras, como é o caso da América do Norte.

A Espanha destaca-se como líder europeu tendo produzido, na referida campanha, 520 600 t., seguida da Grécia com uma produção de 110 000 t., a Itália com 76 200 t. e Portugal com 9 000 t.. No continente africano, o Egipto destaca-se dos demais países produtores de azeitona de mesa com produções anuais próximas dos 20 % ocupando mesmo a segunda posição no *ranking* mundial, seguindo-se Marrocos e Argélia que produzem respectivamente 4,0 % e 5,3 %. No continente asiático, a Turquia ocupa a terceira posição do *ranking* mundial com 15,8 % seguindo-se a Síria com um volume de produção de 6,8 %. No continente americano, a Argentina lidera a produção com 5,9 % seguindo-se o Peru com 3,2 % e os EUA com 1,0 % (COI, 2012).



**Figura 1.** Principais países produtores de azeitona de mesa. Adaptado a partir de dados do COI correspondentes à campanha 2011/2012.

A produção de azeitona de mesa atingiu um elevado volume e representa uma parte substancial da economia de vários países. Na última década tem-se verificado um crescimento progressivo na produção e no consumo mundial de azeitona de mesa (Fig. 2).



**Figura 2.** Evolução da produção e consumo mundial de azeitona de mesa, nos últimos dez anos. Adaptado a partir dos dados do COI (2012).

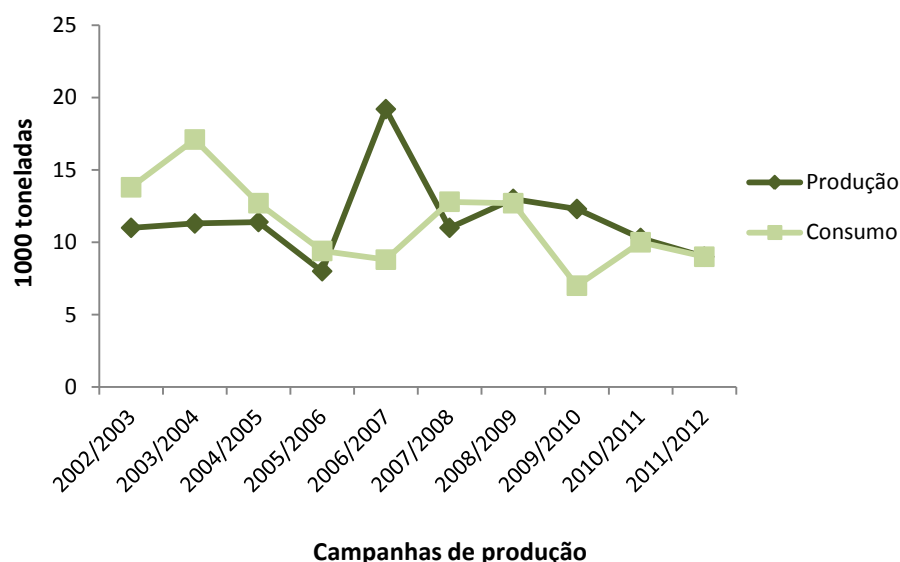
## 1.2 Património Olivícola Nacional

O actual património olivícola nacional constitui um dos sectores determinantes no panorama da agricultura portuguesa desempenhando um papel fundamental não só a nível económico mas também a nível cultural e social.

O olival está presente em cerca de 40 % das explorações e ocupa quase metade da superfície destinada a culturas permanentes. A representatividade do olival no total da Superfície Agrícola Utilizável (SAU) é elevada (9 %) e apenas os prados e pastagens ocupam uma superfície superior (INE, 2009).

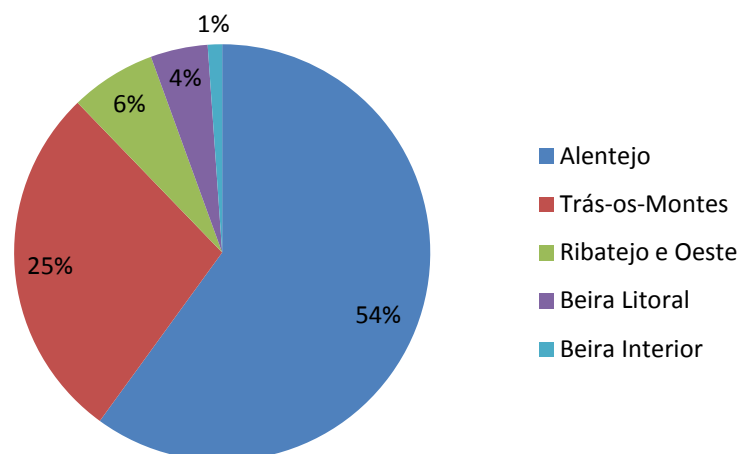
No que respeita à produção de azeitona de mesa em Portugal, segundo os dados disponíveis do Conselho Oleícola Internacional, indicam que é o quarto maior produtor da União Europeia, seguido da Espanha, Grécia e Itália. A produção média anual em Portugal nos últimos 10 anos rondou cerca de 12 000 toneladas (Fig. 3).

Relativamente ao consumo deste produto, os dados disponíveis do COI indicam que Portugal é o quarto país da União Europeia, onde mais se consomem azeitonas de mesa, com um consumo previsto para o ano de 2012/2013 de cerca de 8 000 t. (COI, 2012).



**Figura 3.** Evolução da produção e consumo de azeitona de mesa em Portugal, nos últimos dez anos. Adaptado a partir dos dados do COI (2012).

A cultura da oliveira encontra-se distribuída por todas as regiões agrárias do continente português (Fig. 4). Destacam-se o Alentejo (54 %) e Trás-os-Montes (25 %) como principais regiões produtoras. As regiões do Ribatejo e Oeste, Beira Litoral e Beira Interior posicionam-se na segunda linha do *ranking* da produção nacional (COI, 2012).



**Figura 4.** Principais regiões produtoras de azeitona de mesa em Portugal (COI, 2012).

No que respeita às cultivares de oliveira, apesar de todas poderem ser utilizadas para a produção de azeitona de mesa, algumas possuem melhor aptidão, nomeadamente tamanho do fruto, sabor, forma, firmeza, relação polpa/caroço e facilidade de desprendimento da polpa do respectivo caroço (Barranco *et al.*, 2001; Rejano *et al.*, 2010; Cabezas, 2011).

Em território nacional, são maioritariamente utilizadas 22 cultivares para a produção de azeite e azeitona de mesa. As principais cultivares portuguesas são: *Galega vulgar*, *Negrinha de Trás-os-Montes*, *Cobrançosa*, *Cordovil de Castelo Branco*, *Cordovil de Serpa*, *Madural* e *Verdeal Transmontana* (Leitão *et al.*, 1986). Algumas destas cultivares encontram-se em declínio, ou mesmo em risco de perder -se o seu património genético devido ao número de plantas existentes ser cada vez mais escasso, uma vez que se assiste ao estabelecimento massivo de olivais de cultivares estrangeiras que poderão resultar na perda de autenticidade do azeite e da azeitona portuguesas.

O olival português gera produtos de elevada qualidade contudo, é também criador de paisagem, representa parte integrante de tradição e património e constitui um veículo de construção de roteiros turísticos de valorização do território agrícola. Neste âmbito, é necessário assegurar a garantia da sustentabilidade do uso dos recursos biológicos das cultivares portuguesas numa relação estreita com o conhecimento e as tecnologias, com o objectivo de manter e promover as diversidades biológicas e culturais, garantido a sustentabilidade dos sistemas de produção e a integridade nacional.

A *Galega vulgar* é a cultivar mais extensivamente implantada em Portugal (60%), no entanto, está insuficientemente caracterizada, pelo que são necessários estudos adicionais. Distingue-se facilmente de outras cultivares, devido ao pequeno calibre dos seus frutos, com formato elipsoidal ou ovóide, com ápice arredondado ou pontiagudo apresentando cor violácea no início da coloração e preto na maturação. As características sensoriais únicas do seu azeite e azeitona de mesa têm contribuído para a boa quota de mercado alcançada. O grande interesse por esta cultivar reforça a necessidade de um maior investimento na investigação e na valorização da mesma, a par da sensibilização dos consumidores e dos mercados para as suas particularidades. O método tradicional de preparação de azeitona de mesa Galega é totalmente natural tornando-a um produto perfeitamente adequado aos mercados mais exigentes, onde os alimentos naturais ligados à identidade da região são cada vez mais procurados.

### **1.3 Tipos de processamento**

A azeitona é uma drupa ovalada de cor verde que passa a violácea ou preta quando madura. Pesa entre 1,5 e 12 g e a polpa constitui 70 a 88% do fruto. A azeitona é maioritariamente constituída por água, que representa mais de 50% da sua massa e uma fracção lipídica que dependendo da variedade e do estado de maturação do fruto, ronda os 20 % em massa fresca (Bianchi, 2003). Este fruto, tal como é colhido da árvore, não se encontra apto para ser consumido, sendo processado para torná-lo edível (Jiménez *et al.*, 1995; Ciafardini *et al.*, 2005). O processamento da azeitona tem como principal objectivo a remoção do sabor amargo dos frutos por hidrólise/difusão dos compostos fenólicos, especialmente a oleuropeína (Aponte *et al.*, 2010), o composto fenólico presente em maior quantidade nas azeitonas não processadas (Soler-Rivas *et al.*, 2000; Parinos *et al.*, 2007).

Na escolha da matéria-prima para a elaboração de azeitona de mesa deverá ter-se em conta alguns factores que poderão ser determinantes para definir a sua qualidade, tais como a escolha da cultivar, o volume e a forma do fruto, a boa proporção de polpa/caroço, e as características da mesma, nomeadamente, sabor, firmeza e facilidade de separação do caroço. Não devem ser usados frutos tratados com produtos fitossanitários cujos resíduos não possam ser eliminados ou reduzidos a teores inócuos.

Como referido anteriormente, a produção de azeitona de mesa atinge um elevado volume à escala mundial e representa uma parte substancial da economia de vários países. Consequentemente, a regulamentação do comércio deste produto suscitou a

atenção de organizações nacionais e internacionais. Assim, o Conselho Oleícola Internacional (2004) e a NP- 3034 (2012) definiram os diversos processos tecnológicos que podem ser usados na elaboração da azeitona de mesa procedendo igualmente à regulamentação das suas formas de apresentação e respectivas categorias comerciais (Extra, Categoria I e II).

Os métodos de processamento de azeitona de mesa com maior expressão económica incluem o método Sevilhano (“azeitona verde” ou “estilo espanhol”), o método Californiano (“azeitona preta oxidada” ou “estilo americano”) e o método Grego (“fermentação ao natural”) (Garrido-Fernández *et al.*, 1997). Os diferentes tipos de tratamento têm por objectivo produzir no fruto uma série de transformações, consequência de processos físico-químicos e microbiológicos, que o fazem adquirir as características organolépticas, cor, sabor e textura tão apreciadas universalmente, permitindo simultaneamente a sua conservação por um espaço de tempo prolongado, em condições óptimas para a sua posterior comercialização (Bianchi, 2003). Independentemente do tipo de processamento adoptado, este deve ser realizado respeitando o código de boas práticas sanitárias, de modo a garantir características químicas e microbiológicas correctas (Dabbou *et al.*, 2012).

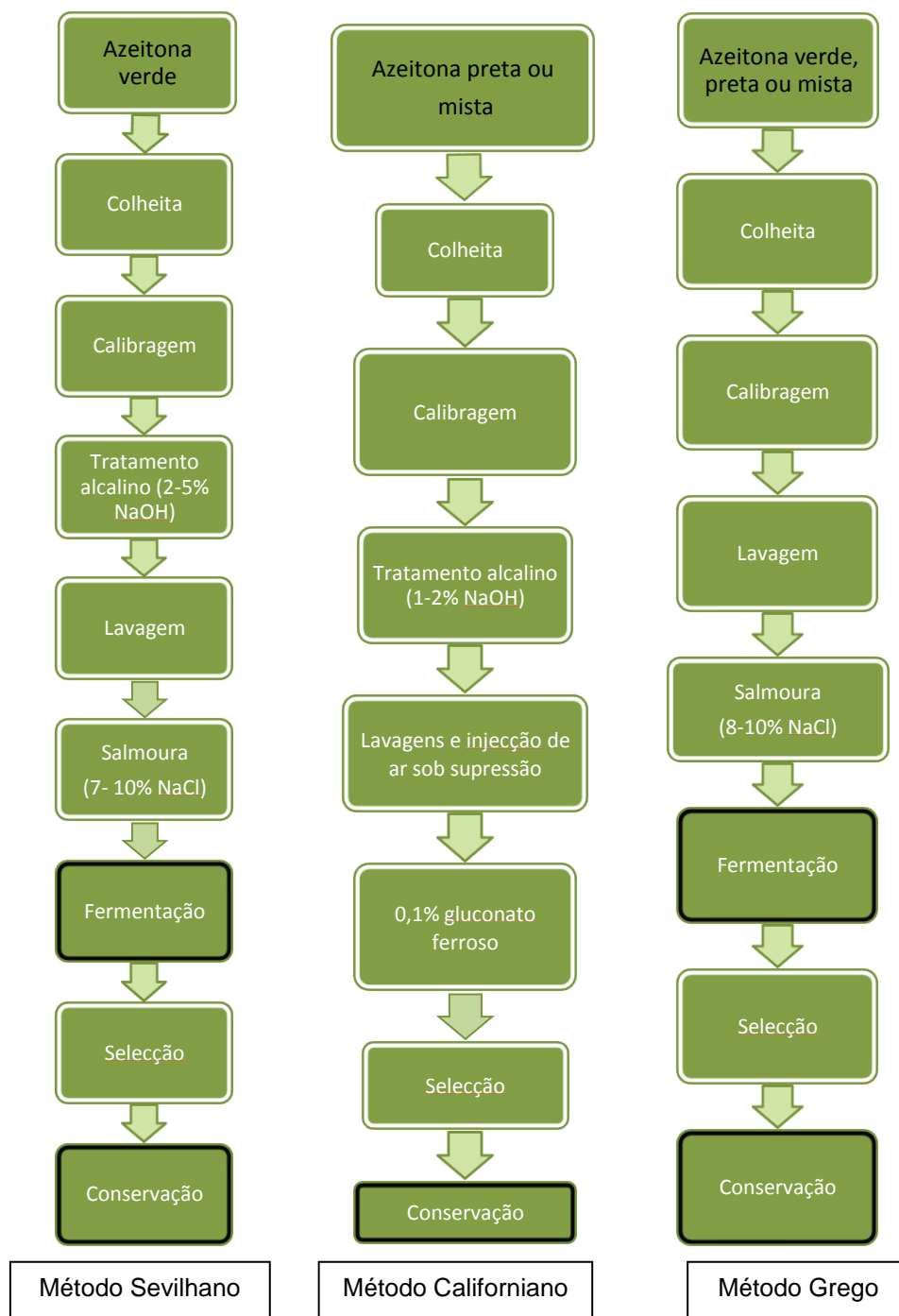
A **azeitona verde do estilo Sevilhano ou Espanhol** (Fig. 5) é preparada a partir de frutos no estado de maturação verde que são submetidos a um tratamento com uma solução de 2 a 5 % (v/v) de NaOH para a eliminação do sabor amargo pela hidrólise alcalina da oleuropeína. A concentração de NaOH a usar, bem como o tempo de residência variam consoante a temperatura, a cultivar e o grau de maturação dos frutos. Posteriormente, a solução alcalina é eliminada e as azeitonas são lavadas repetidamente com água, que remove parte da oleuropeína e os seus produtos de hidrólise, outros polifenóis e alguns dos açúcares fermentescíveis. Seguidamente, os frutos são colocados em salmoura, contendo 7 % a 10 % (m/v) de NaCl, onde se desenvolve a fermentação que deve ser maioritariamente láctica para que possam adquirir as características sensoriais que lhes são peculiares e garantir a sua conservação para serem comercializadas. Uma vez fermentada a azeitona é seleccionada, podendo ser embalada inteira, descaroçada ou recheada com diversos ingredientes (Garrido-Fernández *et al.*, 1997).

A **azeitona preta oxidada por estilo Californiano** (Fig. 5) é preparada a partir de frutos em estado de maturação intermédio (mista) submetidos a tratamento com NaOH para promover a hidrólise dos compostos fenólicos. A azeitona é tratada com uma a cinco soluções de hidróxido de sódio (1 % a 2 %, m/v), por períodos de tempo

variáveis para conseguir uma penetração progressiva do NaOH na polpa não podendo atingir o caroço (Garrido-Fernández *et al.*, 1997). No fim de cada tratamento alcalino a azeitona é lavada com água, à qual é injectado ar sob pressão verificando-se a oxidação dos compostos fenólicos com desenvolvimento/ intensificação da cor preta. Este tratamento permite o escurecimento progressivo tanto da pele como da polpa do fruto. Depois de obtida a cor desejada, continua a ser lavada e oxidada até se atingir aproximadamente um pH 8 (Marsilio *et al.*, 2001). Posteriormente, alcançada a oxidação à última água de lavagem é adicionado 0,1 % (m/v) de gluconato ferroso para estabilizar a cor. Finalmente, a azeitona é escolhida e embalada em salmoura contendo 2 a 4 % (m/v) de NaCl. Uma vez que o produto final possui um nível de acidez baixo, a sua conservação deve ser garantida mediante pasteurização (Garrido-Fernández *et al.*, 1997). O aspecto apelativo do produto final contrasta com o sabor insípido, não sendo o mais adequado ao paladar dos povos mediterrânicos.

A azeitona processada pelo **método Grego** ou também designada por **azeitona ao natural** (Fig. 5) é preparada a partir de frutos completamente desenvolvidos mas ainda verdes, frutos de maturação intermédia (cor violácea) ou frutos maduros que são submetidos a lavagens sucessivas com água ou a uma lavagem prolongada para diminuição do sabor amargo por hidrólise e difusão dos compostos fenólicos. Após lavagem, os frutos são colocados em salmoura, com uma concentração de NaCl entre 8 e 10 % (m/v), podendo utilizar-se concentrações inferiores (6 %) em zonas mais frias (Gómez *et al.*, 2006). Inicia-se assim uma fermentação natural e espontânea, que se pode dar em condições de anaerobiose ou aerobiose, que é levada a cabo não só por bactérias lácticas mas também por *Enterobacteriaceae* e leveduras. Numa fermentação bem sucedida, a microbiota final será constituída apenas por leveduras e bactérias lácticas e a proporção entre estas duas populações é determinante nas características do produto final. A fermentação espontânea é lenta, essencialmente devido à lenta difusão dos açúcares através da epiderme da azeitona para o exterior e devido à presença de oleuropeína e outros compostos fenólicos que possuem actividade antimicrobiana. As leveduras no processo de fermentação assumem um papel muito importante porque estão associadas à produção de álcoois, acetato de etilo, acetaldeído e ácidos orgânicos, compostos que são relevantes para o desenvolvimento de sabor e aroma e para as características de conservação da azeitona de mesa (Hernández *et al.*, 2007; Arroyo-López *et al.*, 2008). Após estas etapas, as azeitonas são classificadas e embaladas em nova salmoura (Garrido-Fernández *et al.*, 1997). De acordo com o estado de maturação do fruto, podem originar azeitona preta ao natural, quando a azeitona que lhe deu origem é colhida em

estado de maturação avançado, ou azeitona mista ao natural quando o seu estado de maturação não é homogêneo. É de salientar que a azeitona produzida segundo o método de fermentação natural, com ou sem adição de substâncias aromáticas, tem um sabor mais acentuado e conserva um ligeiro sabor amargo, devido essencialmente à presença de polifenóis residuais, originando um produto de alto valor funcional, com uma textura e cor característicos (Barranco *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2004; Kanavouras *et al.*, 2005; Cabezas, 2011; Panagou *et al.*, 2011).



**Figura 5.** Diagramas de processamento dos principais tipos de preparação de azeitona de mesa.



Os frutos processados por qualquer um dos três métodos referidos são submetidos a processo de conservação conveniente, adicionados ou não de salmoura. De acordo com a NP 3034 (2012), a salmoura usada na embalagem de azeitona de mesa é definida como uma solução de sal de grau alimentar dissolvido em água potável, com ou sem a adição de outros ingredientes. Esta deve ser límpida, isenta de matérias estranhas não autorizadas e deve obedecer a regras de higiene específicas. São autorizados ingredientes como vinagre, azeite, açúcares, matérias comestíveis como cebola, pimentos, anchovas, especiarias e ervas aromáticas ou extractos naturais e aromas (NP 3034, 2012; COI, 2004).

A salmoura de azeitonas submetidas a uma fermentação natural deve apresentar uma percentagem mínima de 6 % (m/v), de cloreto de sódio um pH máximo de 4,3 e uma percentagem mínima de 0,3 % (m/v) de ácido láctico. Os frutos e a salmoura devem estar isentos de qualquer tipo de degradação microbiana, e estar livres de microrganismos patogénicos e metabolitos produzidos pelos mesmos (COI, 2004).

A azeitona de mesa deve ser acondicionada em embalagens de material inócuo, impermeável e inerte em relação ao conteúdo. Na mesma embalagem apenas devem existir frutos da mesma variedade, com a mesma classificação quanto à qualidade, ao tratamento, forma de apresentação e calibre (NP 3034, 2012). As embalagens usadas devem ser adequadas para permitir uma correcta conservação da azeitona e cumprir a regulamentação relativa a materiais e utensílios destinados a contactar com alimentos. No caso das embalagens com salmoura, estas devem ser preenchidas com o produto (incluindo líquido de cobertura) de forma a não ocupar mais do que 90 % da capacidade do recipiente cheio com água. Esta capacidade corresponde ao volume de água destilada a 20 °C que o recipiente fechado pode conter quando completamente cheio.

Entre os aditivos autorizados pelo COI (2004) a ser utilizados em azeitona de mesa encontram-se conservantes (ácido sórbico e o ácido benzóico), acidificantes (ácido láctico, ácido cítrico, ácido L-(+)-tartárico e ácido acético), antioxidantes (ácido L-ascórbico), sequestrantes (cloreto de cálcio) e co-adjuvantes tecnológicos como culturas *starter*, culturas adjuntas, CO<sub>2</sub> e hidróxido de sódio.

## **1.4 Fermentação**

### **1.4.1 Aspectos microbiológicos**

A fermentação pode ser definida como um processo no qual se verificam alterações bioquímicas dos substratos orgânicos, por acção de catalisadores bioquímicos

produzidos por microrganismos específicos e é utilizada há milhares de anos com o objectivo de conservar e melhorar a qualidade de uma grande variedade de alimentos.

A azeitona de mesa é um produto fermentado em que ocorrem alterações físico-químicas importantes resultantes do metabolismo das populações microbianas que se sucedem nas várias fases da fermentação (Garrido-Fernández *et al.*, 1997).

Os fenómenos que envolvem a fermentação constituem um processo no qual se verificam alterações bioquímicas dos substratos orgânicos, por acção de catalisadores bioquímicos produzidos por microrganismos específicos. Consistem predominantemente numa fermentação láctica que transforma os açúcares em ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico. Outros metabolitos designadamente, o peróxido de hidrogénio, o diacetilo, o anidrido carbónico, os ácidos gordos de cadeia longa e as bacteriocinas podem também surgir (Delgado, 2011). Alguns destes metabolitos secundários contribuem para uma boa capacidade de conservação da azeitona de mesa, dado que possuem propriedades antimicrobianas.

Apesar dos aspectos gerais da fermentação da azeitona de mesa serem bem conhecidos, o investimento na compreensão mais aprofundada dos aspectos bioquímicos e microbiológicos verificou-se nas últimas décadas, embora a origem da arte de preparar este alimento remonte à antiguidade (Panagou *et al.*, 2008).

Os tipos de processamento Sevilhano e Grego envolvem, de um modo geral, uma fermentação espontânea que dá origem a um perfil sensorial que depende da cultivar e da microbiota autóctone, bem como do grau de maturação do fruto e das etapas de processamento pós-colheita (Duran-Quintana *et al.*, 1999; de Castro *et al.*, 2002).

Como acontece com outros vegetais fermentados, as azeitonas fermentadas tradicionalmente possuem uma biodiversidade única constituída essencialmente por leveduras e bactérias lácticas (predominantemente do género *Lactobacillus*) que são particularmente decisivas na qualidade do produto final, quer a nível organoléptico, quer a nível sanitário (Delgado *et al.*, 2005). Sabe-se que estas populações dominantes evitam o desenvolvimento das bactérias indesejáveis através da produção de compostos antimicrobianos (Fernández-Diez *et al.*, 1985). O crescimento espontâneo dos lactobacilos é suficiente para promover uma população adequada. Porém, o uso de um inóculo (cultura adjunta ou cultura *starter*) pode assegurar um predomínio mais rápido da microbiota láctica.

O processo de fermentação é, assim, limitado pela microbiota presente que, por sua vez, depende da disponibilidade dos substratos fermentescíveis, do conteúdo de

cloreto de sódio, do pH e da temperatura, bem como dos teores de oxigénio e dos compostos antimicrobianos presentes, como os compostos fenólicos. Neste sentido, de modo a melhorar a fermentação e produzir produtos de melhor qualidade, é necessário controlar estes parâmetros que influenciam o metabolismo da microbiota existente (Nychas *et al.*, 2002; Panagou *et al.*, 2008; Tofalo *et al.*, 2012). O controlo do processo geralmente incide na manutenção dos níveis de cloreto de sódio e de ácido em valores pré-ajustados.

A fermentação da azeitona ocorre, geralmente, em três fases (Garrido-Fernandez *et al.*, 1997). Durante a primeira fase verifica-se a presença de uma grande diversidade microbiana proveniente do fruto, dos equipamentos e do ambiente circundante. A maioria são bactérias de metabolismo aeróbio, Gram-negativas (*Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* spp., *Aeromonas* spp.), podendo também ocorrer a presença de alguns fungos que tenderão a desaparecer com a manutenção dos baixos níveis de oxigénio (condições de anaerobiose). Estão ainda presentes nesta fase, em quantidades relativamente elevadas, algumas bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter* spp., *Klebsiella aerogenes* e *Escherichia coli*). Estas espécies predominam durante os primeiros dois dias do processo e, com a progressiva redução dos valores de pH tendem a desaparecer dada a sua sensibilidade à presença de ácidos (Garrido-Fernandez *et al.*, 1997).

A segunda fase da fermentação inicia-se com um pH na ordem das 6 unidades que reduz progressivamente, sendo nesta etapa que as bactérias Gram-negativas tendem a desaparecer na sua maioria. Esta fase tem uma duração entre 10 a 15 dias e é caracterizada pelo rápido desenvolvimento de bactérias do género *Lactobacillus* (predominantemente *Lactobacillus plantarum* e em menor quantidade *Lactobacillus pentosus*) e algumas leveduras (*Torulaspora delbrueckii*, *Debaryomyces hansenii* and *Cryptococcus laurentii*) que auxiliam os lactobacilos na degradação de compostos poliaromáticos e sintetizam vitaminas e aminoácidos. Neste tipo de associação, os microrganismos alteram as suas vias metabólicas individuais e os metabolitos por eles produzidos e contribuem eficazmente para as características organoléticas do produto final (Silva *et al.*, 2011; Damiani *et al.*, 1996). Normalmente, a população máxima de *Lactobacillus* spp. é atingida na segunda semana de fermentação a partir da qual tende a estabilizar.

Quando a salmoura atinge um pH na ordem das 4,5 unidades, inicia-se a terceira fase da fermentação. A população microbiana é predominantemente constituída por *Lactobacillus* spp. e leveduras. Estas produzem, entre outros compostos, etanol,

acetaldeído e dióxido de carbono que contribuem para a definição do *flavour* do produto final. São igualmente responsáveis pela produção de uma série de vitaminas que promovem o crescimento de *Lactobacillus* spp.. O processo de fermentação termina aquando do esgotamento dos açúcares presentes na salmoura.

Considera-se que a contribuição das leveduras no processo de fermentação é importante devendo o seu crescimento ser controlado, por algumas espécies poderem converter-se em agentes de alteração microbiana (Wood, 1998). A produção exagerada de compostos voláteis a partir dos açúcares que são necessários às bactérias lácticas pode alterar as características sensoriais do produto e reduzir o seu poder de conservação, pelo que se torna indispensável a manutenção, durante o processo de fermentação, da dominância das bactérias lácticas sobre as leveduras. Em processos de fermentação industriais de cultivares portuguesas, as espécies mais frequentemente identificadas foram *Pichia membranaefaciens*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida oleophila*. Estudos de aptidão tecnológica mostraram que *P. membranaefaciens* e *C. Oleophila* apresentam características promissoras que as podem tornar candidatas a integrar inóculos mistos possíveis de usar no controlo de fermentações (Silva *et al.*, 2011).

#### **1.4.2 Aspectos Físico-químicos**

A polpa da azeitona é constituída essencialmente por água, lípidos e açúcares (Garrido-Fernández *et al.*, 1997). Os açúcares solúveis são o componente mais importante no processo de fermentação da azeitona constituindo a fonte de carbono primária que suporta o crescimento da microbiota presente. A maioria desses açúcares são açúcares redutores (Garrido-Fernández *et al.*, 1997). Os substratos contidos nas azeitonas difundem-se para a salmoura onde são degradados durante a fermentação produzindo ácidos que reduzem o pH do produto (Sánchez *et al.*, 2000). Consequentemente, a acidez da salmoura aumenta e o pH decresce sendo estes factores determinantes para uma fermentação bem sucedida e uma garantia de produto seguro do ponto de vista microbiológico (Spyropoulou *et al.*, 2001).

Os ácidos orgânicos produzidos pela microbiota durante a fermentação são fundamentais contribuindo também para o desenvolvimento de aromas característicos no produto final. Estes ácidos em equilíbrio com os seus sais actuam como um tampão estabilizando o pH da salmoura (Marsilio *et al.*, 2001).

O aroma característico das azeitonas fermentadas está relacionado com a presença de compostos voláteis como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros compostos (Walker, 1998; Sabatini *et al.*, 2008).

Outros compostos importantes da azeitona são os compostos fenólicos responsáveis pelo sabor amargo e pela actividade antioxidante. A maioria dos antioxidantes naturais, com excepção dos tocoferóis, são compostos fenólicos (Ray, 2001). O consumo de polifenóis é benéfico para a saúde humana uma vez que a sua actividade antioxidante está associada com uma redução do risco de doença cardíaca resultante da protecção contra a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade. Testes realizados *in vivo* mostraram que após a ingestão de azeitonas a concentração de polifenóis no sangue aumenta, provando que estes compostos se encontram biodisponíveis (Andrikopoulos, 2010).

No caso da azeitona, o composto fenólico predominante é a oleuropeína (Arroyo-Lopez *et al.*, 2007). No seu processamento, a oleuropeína é hidrolisada por via enzimática ou química. No caso da hidrólise enzimática, as  $\beta$ -glucosidases e esterases presentes no fruto, catalisam a ruptura das ligações glicosídicas e ligações éster libertando hidroxitirosol que apresenta elevada actividade antioxidante. Por sua vez a hidrólise química verifica-se aquando do tratamento alcalino. Esta reacção para além de ser fundamental na eliminação do sabor amargo, é determinante para o desenvolvimento de cor no caso da azeitona preta do tipo californiano.

De uma maneira geral, o processamento tecnológico leva à perda parcial dos compostos fenólicos. As lavagens com água também provocam uma lixiviação dos compostos. Deste modo, a concentração e o tipo de compostos fenólicos presentes na azeitona tratada e fermentada difere substancialmente dos presentes em frutos crus.

As azeitonas processadas pelo método Grego apresentam um maior conteúdo em compostos fenólicos e uma maior capacidade antioxidante em relação a azeitonas submetidas a outros métodos (Pereira *et al.*, 2006). Ao contrário, as azeitonas pretas oxidadas (método Californiano) são as que apresentaram menor teor em compostos fenólicos e menor capacidade antioxidante (Pereira *et al.*, 2006). Já as azeitonas processadas segundo o método Sevilhano apresentaram valores intermédios de compostos fenólicos e de atividade antioxidante, em comparação com os dois outros métodos.

Em suma, o tipo de processamento a aplicar às azeitonas influencia directamente as características físicas, químicas e sensoriais do produto final. Para além disso, as

características intrínsecas às azeitonas, nomeadamente a cultivar e o estado de maturação, também condicionam o produto final.

## **2. AZEITONA PROBIÓTICA- UM NOVO ALIMENTO FUNCIONAL**

### **2.1 Definição e justificação**

A prática de uma alimentação saudável é essencial à vida humana, responsável por fornecer todos os elementos necessários, não só para um bom desenvolvimento físico, mas também para o desempenho de todas as actividades intelectuais e sociais. Estudos demonstram que a qualidade de vida está intimamente associada não só ao estilo de vida de cada indivíduo, mas também ao tipo de dieta praticada no seu quotidiano (Moura, 2005; Cruz *et al.*, 2007). Para além de responder às necessidades nutricionais e proporcionar prazer, alguns alimentos desempenham um terceiro papel – de protecção suplementar contra doenças degenerativas, retardando a incidência ou reduzindo a severidade de doenças crónicas, desde que incluídos regularmente em dietas equilibradas.

Assim, uma crescente preocupação com a saúde incentiva cada vez mais os consumidores na procura de produtos naturais detentores de propriedades benéficas para o organismo. Neste sentido, a oferta de géneros alimentícios tem vindo a evoluir, sendo disponibilizado um número crescente de produtos funcionais que, para além do seu valor nutricional, veiculam elementos químicos e físicos que melhoram o estado de saúde, ou o bem-estar, e/ou reduzem o risco de doença (Ried, 2005). Por isso, as estratégias de comercialização do mercado alimentar direccionam hoje sobretudo para o desenvolvimento de novos produtos funcionais, nomeadamente de alimentos probióticos.

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e a Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO, 2002), define probióticos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades apropriadas conferem benefícios para a saúde do hospedeiro”. Neste sentido, um microrganismo probiótico deve necessariamente sobreviver às condições adversas do tracto digestivo, colonizar o intestino, ainda que temporariamente, por adesão ao epitélio intestinal (Lee *et al.*, 1999).

Vários estudos foram realizados com o intuito de provar os benefícios dos probióticos para o hospedeiro e explicar a sua acção no organismo. Na tabela 1 encontram-se os principais benefícios dos probióticos quando administrados em condições e quantidades adequadas.

**Tabela 1** - Principais benefícios para a saúde dos alimentos probióticos.

<b>Benefícios dos probióticos</b>	<b>Referência</b>
Prevenção de diarreias por disbiose causada por antibioterapia ou tratamento de disbiose após uso de antibiótico	Marteau <i>et al.</i> , 2001
Redução da intolerância à lactose por modulação da microbiota intestinal	Peres <i>et al.</i> , 2012
Efeito antiinflamatório em doenças intestinais como a doença inflamatória intestinal e o síndrome do cólon irritável	Goossens <i>et al.</i> , 2003
Prevenção de cancro do cólon	Commanea <i>et al.</i> , 2005
Tratamento de infecções urogenitais	Peres <i>et al.</i> , 2012
Controlo de gastrites associadas a <i>Helicobacter pylori</i>	Sgouras <i>et al.</i> , 2004
Estimulação do sistema imunitário	O'Flaherty e Klaenhammer, 2010
Redução de sintomatologia alérgica e do eczema atópico	Marschan <i>et al.</i> , 2008
Restauração da microbiota intestinal e melhoramento de enzimas hepáticas com lesões induzidas pelo consumo de álcool	Kirpich <i>et al.</i> , 2008

As estirpes probióticas usadas para a incorporação em alimentos devem ser consideradas seguras (*Generally Recognized as Safe* - GRAS) e não devem causar alterações sensoriais indesejáveis no sabor, aroma, textura e outros atributos importantes (Cruz *et al.*, 2009). Além disso devem suportar as aplicações industriais, as condições do meio ambiente e serem capazes de crescer/sobreviver em níveis adequados no produto durante o seu tempo de prateleira (Donkor *et al.*, 2007). Os microrganismos comumente utilizados em preparações probióticas pertencem ao grupo das bactérias lácticas e incluem-se sobretudo nos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. No entanto, existem também organismos probióticos não bacterianos, tal como, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Sanders *et al.*, 2007; Kuhle e Jespersen, 2003).

A maioria das estirpes probióticas comerciais são de origem humana ou láctea e têm sido utilizadas, quase exclusivamente, na produção de produtos lácteos fermentados. Como resultado e seguindo a tendência natural para a diversificação de produtos, a indústria alimentar tem-se direccionado para os alimentos de origem não-láctea que possam também contribuir para o regular consumo de probióticos, constituindo assim

uma alternativa tecnológica que atende as exigências do consumidor actual. A adopção de uma dieta isenta de produtos de origem animal e a intolerância à lactose são alguns exemplos dessas exigências (Heenan *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2004).

As características físico-químicas da matriz do alimento e o seu processamento são factores que devem ser avaliados durante o desenvolvimento de novos produtos probióticos de modo a permitir uma maior sobrevivência dos microrganismos probióticos. Desta forma, estudos demonstram que as matrizes de vegetais fermentados podem também constituir um veículo biológico alternativo para bactérias probióticas (Lavermicocca *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2004). Contudo, apenas algumas culturas probióticas usadas com sucesso em produtos lácteos exibiram viabilidades aceitáveis em matrizes vegetais durante o período de consumo (Haller *et al.*, 2001), uma vez que factores como a elevada acidez e/ou concentração de sal influenciaram a sua sobrevivência (Champagne *et al.*, 2005). Neste sentido, Karasu *et al.* (2010) e Rivera-Espinoza e Gallardo-Navarro (2010) demonstraram que a adição de estirpes de bactérias lácticas com potencial probiótico, isoladas das próprias matrizes de vegetais fermentados, ao seu processo fermentativo pode ajudar a superar tais desafios tecnológicos.

Além dos aspectos tecnológicos propriamente ditos, o controlo da viabilidade das estirpes probióticas no alimento que serve de veículo no momento de consumo assume uma crucial importância. Para assegurarem um efeito benéfico e a sua prevalência na composição da microbiota intestinal, os alimentos probióticos devem conter um mínimo de  $10^6$  ufc/g ou ml de microrganismos probióticos (FAO/WHO, 2002). De acordo com Gupta e Garg (2009), para obter alguns dos efeitos probióticos desejados sobre o estado geral do paciente, é recomendada a ingestão diária de  $5 \times 10^9$  ufc durante 5 dias.

O processo tradicional de fermentação de azeitona é espontâneo e é consequência da actividade de uma sucessão de populações microbianas provenientes do fruto, dos equipamentos e do ambiente circundante, constituída principalmente por bactérias lácticas e leveduras. Durante o processo, predominam as bactérias lácticas do género *Lactobacillus*- género a que pertencem a maioria dos probióticos comercializados- particularmente as espécies *L. plantarum* e *L. pentosus* (Garrido-Fernandez *et al.*, 1997).

As estirpes probióticas de *L. plantarum* actualmente disponíveis são de origem intestinal, mas Haller *et al.* (2001) e Morad e Nour-Eddine (2006) provaram que os mesmos metabolitos e as propriedades funcionais inerentes a esta espécie podem



também encontrar-se em estirpes de *L. plantarum* provenientes de vegetais fermentados. Testes *in vitro* efectuados com estirpes de *L. pentosus* isoladas de azeitona de mesa fermentada evidenciaram que estas possuíam uma elevada resistência às condições do tracto gastrointestinal, uma boa capacidade de aderência às células do epitélio intestinal e um efeito antagonista contra patogénios, sugerindo uma promissora aptidão probiótica das mesmas (Bautista-Gallego *et al.*, 2013).

Neste contexto, a azeitona de mesa fermentada, constitui um veículo alimentar promissor para o desenvolvimento de um alimento funcional probiótico, uma vez que para além de apresentar características morfológicas e nutritivas adequadas, particularmente na epiderme do fruto, para a sobrevivência de populações microbianas, nomeadamente de bactérias lácticas probióticas (Lavermicocca *et al.*, 1998; Nychas *et al.*, 2002; Bautista-Gallego *et al.*, 2013; Rodriguez-Gomez *et al.*, 2013), é consumida regularmente pela população, sendo este um factor essencial para que os benefícios atribuídos aos probióticos sejam exercidos. Adicionalmente, alguns dos componentes da azeitona podem ser considerados como prebióticos, nomeadamente alguns polissacáridos, conhecidos como fibras dietéticas. A azeitona de mesa constitui ainda uma excelente fonte de ácidos gordos monoinsaturados (ómeegas 3, 6 e 9), minerais, vitaminas e compostos fenólicos (Jimenez *et al.*, 2000; López-López *et al.*, 2007). Em suma, a “probióticação” (Yoon *et al.*, 2004) da azeitona de mesa constitui uma forma de incrementar a qualidade de um produto tradicional, não desvirtuando as características a ele intrínsecas, permitindo posicionar a azeitona de mesa fermentada entre os novos alimentos funcionais como forma de valorizar e potenciar as características saudáveis deste alimento da dieta mediterrânea.

## **2.2 Critérios de selecção de novas estirpes probióticas e utilização das mesmas como culturas adjuntas na fermentação de azeitona**

O consórcio microbiano natural da azeitona fermentada é muito complexo e é responsável por reacções de adaptação fisiológica ao ecossistema azeitona/salmoura, em complementaridade ou concorrência, para promoção do equilíbrio das potencialidades individuais dos parâmetros envolvidos (Delgado *et al.*, 2011).

Estudos de ecologia microbiana de processos fermentativos de azeitona evidenciam uma sucessão de populações mistas (*Enterobacteriaceae*, bactérias lácticas e leveduras), bem como uma fonte promissora de novas estirpes de bactérias lácticas com aptidão probiótica (Lavermicocca *et al.*, 2002; Haller *et al.* 2001; Morad e Nour-Eddine, 2006; Bautista-Gallego *et al.*, 2013; Argyri *et al.*, 2013).

Para o reconhecimento científico do mérito de uma bactéria como agente probiótico, é necessário o apoio de estudos laboratoriais *in vitro* e *in vivo* que demonstrem a capacidade do microrganismo para percorrer e colonizar o tracto gastrointestinal humano, multiplicar-se e estimular de forma positiva a microbiota entérica. Os critérios de selecção de novas estirpes probióticas para uso em alimentos ou suplementos alimentares incluem normas orientadoras relativas à taxonomia, segurança, funcionalidade e aspectos tecnológicos das culturas (FAO/WHO, 2002; Salminen *et al.*, 1998).

O primeiro passo na selecção de uma estirpe probiótica é a determinação da sua classificação taxonómica, a qual poderá indicar a origem, habitat e fisiologia da estirpe sob estudo (Morelli, 2007). Constatase que não são apenas organismos comensais encontrados no intestino humano que possuem aptidão probiótica. A identidade da estirpe é importante para estabelecer a relação causal entre estirpe e efeito benéfico para além de permitir estudos epidemiológicos e de vigilância adequados (Reid *et al.*, 2005).

O segundo passo constitui na avaliação da segurança das bactérias utilizando testes *in vitro* ou modelos animais. Directrizes internacionais indicam que a segurança dos probióticos deve reunir um conjunto de princípios gerais, bem como critérios práticos a fim de fornecer orientações sobre a forma como um dado microrganismo com potencial probiótico deve ser testado no sentido de averiguar se possui baixo risco em induzir patologia e se não possui associação a um agente etiológico.

As bactérias lácticas pertencentes aos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são comumente usadas em probióticos dado o seu longo histórico relativamente à sua segurança (Ouwehand *et al.* 1999; Saxelin *et al.*, 2005). Estas possuem o estatuto GRAS, ou seja, *Generally Regarded As Safe* concedido pela *American Food and Drug Agency* (FDA) (Ammor *et al.*, 2007). Na Comunidade Europeia o estatuto QPS, *Qualified Presumption of Safety* foi concedido pela *European Food Safety Authority* (EFSA). Contudo, nos últimos anos a segurança destes microrganismos começou a ser questionada devido a relatos de infecções, como bacteremias (Salminen *et al.*, 2004), endocardites (Mackay *et al.*, 1999) e septicemia (Chromarat e Espinouse., 1991). Infecções causadas por *Lactobacillus* spp. probióticos são extremamente raras, tendo sido relatados alguns casos em indivíduos imunodeprimidos, o que indica que devem ser tomados cuidados na administração de probióticos por parte destes indivíduos. Devido à ocorrência destes casos, a exigência da avaliação da segurança das estirpes probióticas tem vindo a aumentar (Vesterlund *et al.*, 2007). Segundo a

FAO/WHO (2002), os microrganismos probióticos devem possuir carácter não-patogénico (ausência de factores de virulência, como por exemplo actividade hemolítica), bem como ausência de plasmídeos com genes de resistência a antibióticos passíveis de serem transferidos horizontalmente a outras bactérias comensais ou oportunistas. O terceiro passo centra-se na caracterização funcional através de testes *in vitro* ou modelo animal. A funcionalidade da estirpe probiótica está ligada à sua capacidade de resistir às condições adversas do tracto gastrointestinal do hospedeiro e à sua habilidade antagonista contra patógenos residentes (Turner *et al.*, 2001; Ruiz-Moyano *et al.*, 2008). Assim, os microrganismos probióticos devem sobreviver à acidez gástrica e à actividade hidrolítica dos sais biliares e, ainda, possuírem a capacidade de aderir à superfície do epitélio intestinal bem como, reduzir a aderência de patógenos, seja pela produção de compostos antagonistas (bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogénio) ou pela competição por sítios de aderência (Morelli, 2000; Saarela *et al.*, 2002; Motta *et al.*, 2006).

Outro aspecto importante na selecção de uma nova estirpe probiótica é o estudo das suas propriedades tecnológicas. Um alimento probiótico deve conter estirpes que sobrevivam durante o seu processamento e armazenamento em teores adequados para que os seus benefícios para o consumidor sejam exercidos. Além disso, estas não devem causar alterações sensoriais indesejáveis no sabor, aroma, textura e outros atributos importantes do produto (Cruz *et al.*, 2009; Settanni e Moschetti, 2010). O uso da azeitona de mesa como veículo biológico para estirpes de *Lactobacillus* spp. com potencial probiótico provenientes da sua própria matriz, é um aspecto tecnológico promissor a ter em conta. Contudo, para que a população probiótica se consiga implementar com sucesso no fruto deve possuir determinadas propriedades tecnológicas, tais como: resistência ao efeito antimicrobiano dos compostos fenólicos; sobrevivência na presença de estirpes da microbiota indígena pertencentes à mesma espécie; rápida acidificação; utilização completa de açúcares fermentescíveis; tolerância a elevados níveis de sal e baixo pH (Sisto e Lavermicocca, 2012).

O estudo das propriedades tecnológicas e funcionais de estirpes de *Lactobacillus* spp. pertencentes à microbiota natural de azeitona fermentada poderá contribuir para valorizar a azeitona de mesa fermentada enquanto produto tradicional. Com base na potencialidade das novas estirpes será possível aumentar a qualidade da azeitona de mesa ao natural nos diferentes aspectos (sensorial, nutritivo), aumentar a diversificação do produto (produtos melhorados, novos produtos) e contribuir para a preservação da biodiversidade microbiana presente nestes processos.

### III - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3. Avaliação *in vitro* da aptidão probiótica de estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural

**Hipótese:** A azeitona ao natural constitui uma fonte de estirpes de *Lactobacillus* spp. com potencial probiótico.

##### 3.1 Material biológico e condições de cultura

**Bactérias lácticas:** previamente foram isoladas e identificadas ao nível do género pelos métodos convencionais e moleculares - 156 estirpes de bactérias lácticas de azeitona preta ao natural da cv. *Galega vulgar*. Os isolados pertencentes ao género *Lactobacillus* foram submetidos a uma avaliação da sua tolerância ao ácido e aos sais biliares e os que demonstraram possuir uma elevada tolerância às condições testadas foram identificados ao nível da espécie pelo método *multiplex*-PCR para detecção do gene *recA* com os primers específicos para as espécies *L. plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus* (Torriani *et al.*, 2001). Assim, foram seleccionadas 3 estirpes: *L. plantarum* 614, *L. paraplantarum* A1 e *L. pentosus* B96, como objecto de estudo para a avaliação do potencial probiótico. Como estirpe probiótica de referência em todos os ensaios utilizou-se a *L. casei* Shirota (gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia, Biotecnologia Alimentar da Universidade de Agricultura de Atenas, Grécia).

As estirpes estudadas encontravam-se conservadas a - 80 °C em glicerol (80 %, v/v). A sua reactivação foi conseguida através de dupla cultura em caldo MRS (pH 6,2, Merck, Darmstadt, Alemanha) a 37 °C durante 20 e 16 h, respectivamente, em aerobiose. Após o segundo período de incubação, as células encontravam-se no final da fase de crescimento exponencial.

**Bactérias patogénicas:** *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (pertencentes à colecção do Laboratório de Tecnologia em Microbiologia Alimentar, ITQB, Oeiras, Portugal).

As estirpes foram conservadas a - 80 °C em glicerol (80 %, v/v) e a sua reactivação foi conseguida através de dupla cultura em TSB (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) a 37 °C durante 20 e 16 h, respectivamente, em aerobiose.

**Cultura celular:** a linha celular (células derivadas de adenocarcinoma de cólon humano) Caco-2 (DSMZ ACC 169) foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Nutracêuticos e Libertação Controlada, IBET, Oeiras, Portugal.

As células Caco-2 foram cultivadas em frascos T contendo meio RPMI 1640 GlutaMax (Gibco, Paisley, Reino Unido) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal de bovino (Gibco) e 1 % (v/v) de Pen-Strep (Gibco) e foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> e 95 % de ar (Galaxy 170S, New Brunswick, EUA).

A subcultura das células foi efectuada sempre que estas apresentavam uma confluência superior a 90 %.

Para determinar a concentração celular e realizar uma sub-cultura, as células foram removidas enzimaticamente dos frascos T com uma solução 0,05 % (v/v) de Tripsina-EDTA (Gibco) durante aproximadamente 5 min a 37 °C.

A viabilidade celular foi determinada antes de todas os ensaios pelo método de exclusão com o corante azul de tripano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Assim, a 20 µL de suspensão celular adicionou-se 100 µL de uma solução de 1 % (v/v) de azul de tripano perfazendo uma proporção de 1:5 (amostra:corante). A suspensão corada foi colocada em câmara de Neubauer (profundidade 0,200 mm, resolução 0,0625 mm<sup>2</sup>, Fuchs-Rosenthal, Paul Marienfeld GmbH & Co., Lauda-Königshofen, Alemanha) e observada ao microscópio invertido (Motic AE31, BC, Canadá). A viabilidade é dada em percentagem do número de células viáveis em relação ao número total de células. Em todas os ensaios realizados, foram utilizadas células com mais de 90 % de viabilidade.

## **3.2 Metodologias analíticas**

### **3.2.1 Critérios de selecção de estirpes probióticas relativos à segurança**

#### **3.2.1.1 Avaliação da patogenicidade**

##### **Actividade hemolítica**

A actividade hemolítica das estirpes de *Lactobacillus* spp. em estudo foi avaliada através da inoculação em estria, das suas culturas em caldo MRS com 16 h de crescimento, em placas de meio Columbia agar suplementado com 5 % de sangue de cavalo (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França). Estas foram incubadas a 37 °C durante 48 h. A estirpe *Staphylococcus aureus* foi utilizada como controlo positivo. Como controlo negativo, usou-se a estirpe probiótica de referência *L. casei* Shirota.

A reacção hemolítica pode ser verificada pela formação de zonas claras em torno da colónia ( $\beta$  -hemólise), pela formação de pigmento verde em torno da colónia ( $\alpha$  -hemólise) ou pela ausência de reacção ( $\gamma$  - hemólise).

**Nota:** Foram efectuados três ensaios independentes para cada um dos isolados.

### **Actividade mucolítica**

A actividade mucolítica dos isolados foi avaliada através da sua inoculação num meio de cultura contendo mucina gástrica de suíno (HGM – tipo III, Sigma-Aldrich) recorrendo aos métodos adaptados de Abe *et al.*, (2010). A mucina gástrica de suíno possui propriedades estruturais e químicas semelhantes à mucina gástrica humana.

O referido meio foi efectuado usando o meio basal descrito na metodologia referenciada suplementado com 1,5 % (m/v) de agar (Becton Dickinson, NJ, EUA), 0,3% (m/v) de mucina gástrica de suíno parcialmente purificada e 1 % (m/v) de glucose. Posteriormente foram inoculados 2  $\mu$ L de cada uma das culturas dos isolados em estudo com 16 h de crescimento na superfície das placas de Petri contendo o meio anteriormente descrito e foram incubadas a 37 °C durante 72 h, em aerobiose. Após este período de incubação, adicionou-se uma solução de ácido acético 3,5 M com 0,1% (m/v) de amido preto (Merck) corando toda a superfície da placa durante 30 min. Seguidamente lavou-se com uma solução de ácido acético 1,2 M até se observar uma zona clara (zona de lise da mucina) em torno das colónias correspondentes aos controlos positivos (*E. coli* e *S. Typhimurium*). Como controlo negativo, foi usada a estirpe *L. casei* Shiota.

**Nota:** Foram efectuados três ensaios independentes para cada um dos isolados

#### **3.2.1.2 Avaliação da resistência a antibióticos**

A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) para cada um dos antibióticos em estudo foi efectuada através do método de microdiluição em meio líquido de acordo com os métodos adaptados de D'Aimmo *et al.*, 2007 e Wiegand *et al.*, 2008, testando-se a sensibilidade dos isolados relativamente a 8 antibióticos referenciados no parecer científico elaborado em 2012 pelo painel da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar para aditivos e produtos ou substâncias utilizados na alimentação animal (FEEDAP).

Os antibióticos foram utilizados nos seguintes intervalos de concentração: cloranfenicol (2 a 1024  $\mu$ g/mL), tetraciclina (2 a 1024  $\mu$ g/mL), canamicina (2 a 1024

μg/mL), gentamicina (2 a 1024 μg/mL), estreptomicina (2 a 1024 μg/mL), ampicilina (2 a 256 μg/mL), eritromicina (2 a 1024 μg/mL) e vancomicina (2 a 1024 μg/mL), (todos provenientes da Sigma-Aldrich).

Para o ensaio foram utilizadas culturas dos isolados de *Lactobacillus* spp. em estudo em caldo MRS com 16 h de crescimento. Estas foram centrifugadas (5000 x g, 5 min; 4 °C), as células foram ressuspensas em tampão fosfato-salino (pH 7,0) e a absorvância (600 nm) foi ajustada a  $0,8 \pm 0,01$  por espectrofotometria (Jasco V-530, Toquio, Japão). Seguidamente, as diluições seriadas dos antibióticos em estudo foram distribuídas em microplacas de 96 poços (Sarstedt, Newton, EUA), cada um dos poços foi inoculado com 1% (v/v) das suspensões celulares dos diferentes isolados perfazendo um volume final de 200 μL e, por fim, estas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Nas microplacas foram também incluídos poços para o controlo de viabilidade do crescimento bacteriano (suspensão bacteriana apenas em meio de cultura – controlo positivo) e o controlo de esterilidade do meio de cultura (controlo negativo). Após o período de incubação referido, foi determinada a CMI definida como a menor concentração de antibiótico capaz de provocar uma inibição visível e completa do crescimento bacteriano (Wiegand *et al.*, 2008). Os perfis de resistência dos isolados em estudo foram avaliados de acordo com os valores de *cut-off* reportados pela EFSA (EFSA, 2012).

**Nota:** Foram efectuados dois ensaios independentes para cada estirpe e cada concentração de antibiótico foi testada em triplicado.

### **3.2.2 Critérios de selecção de estirpes probióticas relativos à funcionalidade**

#### **3.2.2.1 Resistência ao processo digestivo simulado**

O ensaio pretendeu simular as condições gastrointestinais humanas de uma forma contínua e sequencial, recorrendo aos métodos adaptados de Palencia *et al.*, 2008 (Fig. 6).

Foram utilizadas quatro culturas de 35 mL em caldo MRS de cada isolado de *Lactobacillus* spp. em estudo com 16 h de crescimento. Estas foram centrifugadas (5000 x g; 5 min; 4 °C), as células foram ressuspensas no mesmo volume de uma solução electrolítica (6,2 g/L de NaCl; 2,2 g/L de KCl; 0,22 g/L de CaCl<sub>2</sub>; 1,2 g/L de NaHCO<sub>3</sub>) de pH 6,2 (**G1**).

Para simular as condições *in vivo* da saliva, as suspensões bacterianas foram submetidas a um tratamento com 5 mL da solução electrolítica com lisozima (0,01 %, m/v, Sigma-Aldrich) (**G2**). Seguidamente simularam-se as condições gástricas. Para

tal, adicionou-se às suspensões resultantes da etapa G2, 3 mL da solução electrolítica de pH 5,0 contendo pepsina (0,3 %, m/v, Sigma-Aldrich) (**G3**) e posteriormente foi efectuada a simulação da descida gradual de pH no estômago (4,1 (**G4**); 3,0 (**G5**); 2,1 (**G6**) e 1,8 (**G7**)) através da adição de uma solução de HCl (1 M). Nas etapas G3 a G7, descritas anteriormente, as suspensões bacterianas foram submetidas a períodos de incubação de 20 min a 37 °C em banho termostatzado com agitação (50 rpm, Unitronic-OR, Selecta, Barcelona, Espanha).

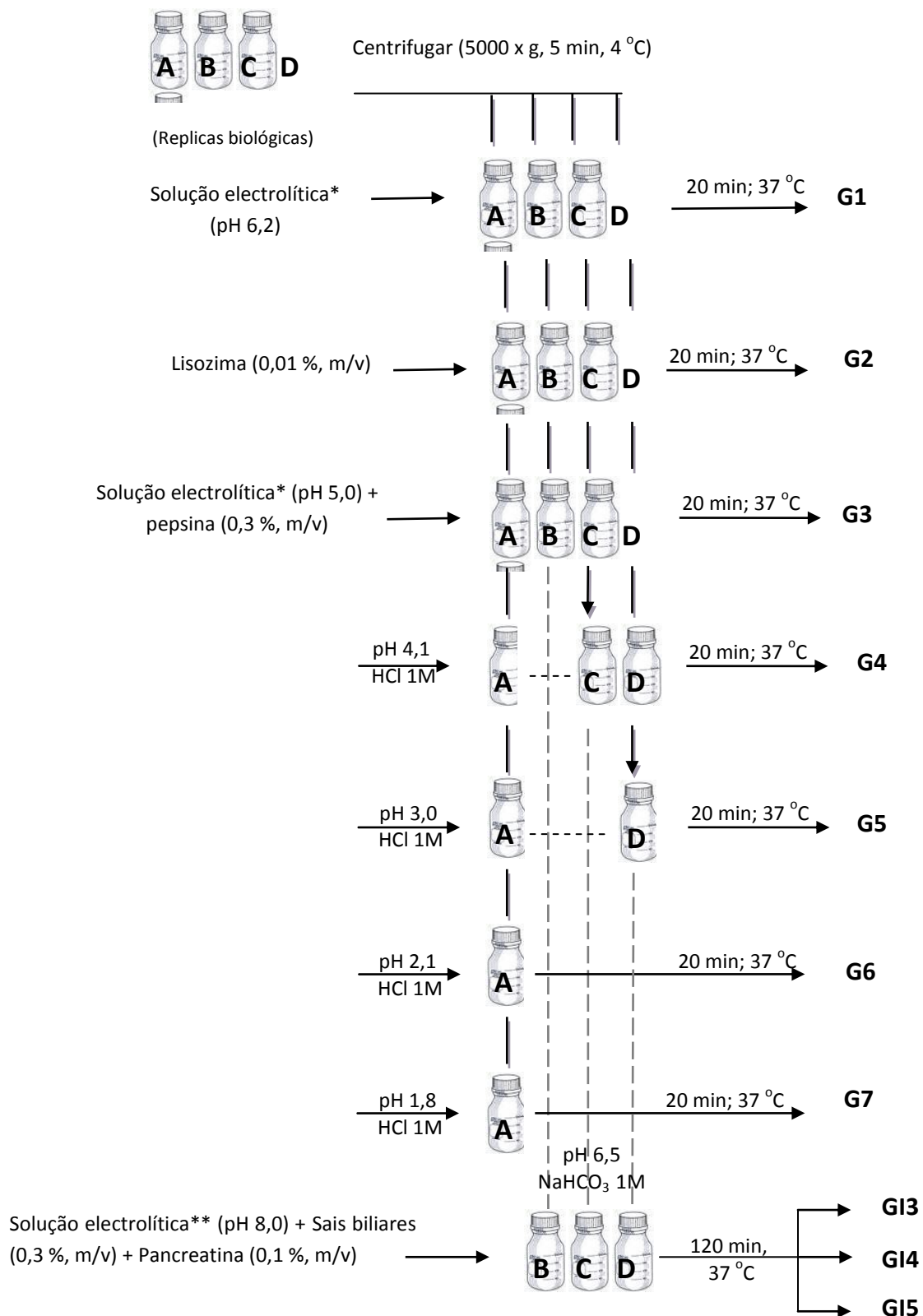
Para simular o *stress* intestinal, o pH das amostras G3, G4 e G5 foi ajustado para 6,5 com uma solução de NaHCO<sub>3</sub> (1 M) e posteriormente foram adicionados 4 mL de uma solução electrolítica (5,0 g/L de NaCl; 0,6 g/L de KCl; 0,3 g/L de CaCl<sub>2</sub>) de pH 8,0 contendo sais biliares (0,45 %, m/v, Oxoid) e pancreatina (0,1 %, m/v, Sigma-Aldrich). Para simular as condições presentes no intestino delgado, as amostras resultantes destas etapas (**GI3, GI4 e GI5**) foram incubadas a 37 °C em banho termostatzado com agitação (50 rpm) durante 120 min.

Em cada uma das etapas do processo digestivo descritas, monitorizou-se a viabilidade celular por plaqueamento em MRS agar (Vinderola *et al.*, 2000).

**Nota:** Foram efectuados dois ensaios independentes para cada isolado em estudo.



**Culturas em caldo MRS com 16 h  
de crescimento a 37 °C**



\* 6,2 g/L de NaCl; 2,2 g/L de KCl; 0,22 g/L de CaCl<sub>2</sub>; 1,2 g/L de NaHCO<sub>3</sub>

\*\* 5,0 g/L de NaCl; 0,6 g/L de KCl; 0,3 g/L de CaCl<sub>2</sub>

**Figura 6.** Representação esquemática da simulação *in vitro* do processo digestivo humano

### 3.2.2.2 Avaliação da capacidade de colonização e aderência ao epitélio intestinal

#### Estudo das propriedades de auto-agregação, co-agregação e hidrofobicidade

Os ensaios de auto-agregação e co-agregação com *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* foram efectuados recorrendo aos métodos adaptados de Del Re *et al.*, 2000; El-Naggar, 2004 e Taheri *et al.*, 2009.

No estudo da auto-agregação foram utilizados 5 mL de uma cultura de cada isolado de *Lactobacillus* spp. em caldo MRS com 16 h de crescimento. Procedeu-se à sua centrifugação (5000 x g; 5 min; 4 °C) e conservou-se o sobrenadante para posterior utilização no ensaio. Seguidamente efectuaram-se duas lavagens das células com uma solução tampão fosfato-salino (0,5 M; pH 7,0), estas foram ressuspensas em 5 mL da referida solução e a absorvância (600 nm) foi ajustada a  $0,5 \pm 0,01$  por espectrofotometria. Posteriormente a suspensão celular resultante foi centrifugada (5000 x g; 5 min; 4 °C), o sobrenadante foi eliminado e as células foram ressuspensas no meio original. A cultura resultante foi incubada a 37 °C durante 2 h. Após este período, foi retirado 1 mL da sua parte superior e mediu-se a absorvância (600 nm) (**Abs<sub>1</sub>**). Seguidamente esta foi agitada e mediu-se a absorvância (600 nm) total (**Abs<sub>2</sub>**). A percentagem de auto-agregação (A) foi calculada recorrendo à equação 1.

$$\% A = [1 - (Abs_1 / Abs_2)] \times 100$$

(Eq. 1)

No ensaio da co-agregação foram utilizados 5 mL de uma cultura de cada estirpe patogénica em TSB e 5 mL de uma cultura de cada isolado de *Lactobacillus* spp. em estudo em caldo MRS, ambas com 16 h de crescimento. Estas foram centrifugadas (5000 x g; 5 min; 4 °C), as células foram ressuspensas em tampão fosfato-salino (0,5 M; pH 7,0) e a absorvância (600 nm) foi ajustada a  $0,5 \pm 0,01$  por espectrofotometria. Seguidamente procedeu-se à mistura de 0,5 mL da suspensão de cada um dos isolados de *Lactobacillus* spp. em estudo com 0,5 mL da suspensão de cada uma das estirpes patogénicas e homogeneizou-se por vortex (10 s). Como controlo, utilizou-se 1 mL de cada uma das diferentes suspensões bacterianas (*Lactobacillus* spp. e patogénicas). Todas as suspensões foram incubadas a 37 °C durante 4 h e após este período foram medidas as respectivas absorvâncias (600 nm). A percentagem de co-agregação (CoA) foi calculada recorrendo à equação 2.

$$\% CoA = [((Abs_{controlo\ Lactobacillus} + Abs_{controlo\ patogénico})/2 - Abs_{mistura}) / ((Abs_{controlo\ Lactobacillus} + Abs_{controlo\ patogénico})/2)] \times 100$$

(Eq. 2)

A hidrofobicidade da superfície celular das bactérias foi determinada medindo a aderência microbiana aos hidrocarbonetos recorrendo aos métodos de Marin *et al.*, 1997. Para tal, foram utilizadas 5 mL de uma cultura de cada isolado de *Lactobacillus* spp. em caldo MRS com 16 h de crescimento. Estas foram centrifugadas (5000 x g; 5 min; 4 °C), as células foram ressuspensas em tampão fosfato-salino (0,02 M; pH 7,0) e mediu-se a absorvância (600 nm) (**Abs<sub>0</sub>**). Posteriormente foram adicionados 0,4 mL de xileno a 3 mL da suspensão celular resultante, homogeneizou-se a mistura por vortex (30 s) e deixou-se a repousar durante 15 min para a separação das fases aquosa e orgânica. Após este período, a fase aquosa foi removida cuidadosamente e procedeu-se à medição da sua absorvância (600 nm) (**Abs<sub>1</sub>**). A percentagem de hidrofobicidade (H) foi calculada recorrendo à equação 3.

$$\% H = [(Abs_0 - Abs_1 / Abs_0)] \times 100$$

(Eq. 3)

**Nota:** Todos os ensaios acima descritos foram efectuados em triplicado para cada um dos isolados em estudo.

#### **Avaliação da capacidade de aderência aos enterócitos Caco-2**

Foram colocados 2 mL de uma suspensão de células Caco-2 contendo 5x10<sup>4</sup> células/mL em cada um dos 6 poços de uma placa de cultura de tecidos (9,5 cm<sup>2</sup>) (Sarstedt). As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera humidificada com 5 % de CO<sub>2</sub> / 95 % de ar durante cerca de 2 semanas até formação de uma monocamada confluenta na superfície do poço, tendo sido trocado o meio a cada 2 dias. Após este período, as células encontravam-se em condições adequadas (confluência > 90%) para serem usadas no ensaio de avaliação da capacidade de aderência dos isolados de *Lactobacillus* spp. em estudo às células Caco-2, recorrendo aos métodos adaptados de Anderson *et al.*, 2010.

Para tal, foram utilizadas culturas dos isolados em caldo MRS com 16 h de crescimento. Estas foram centrifugadas (5000 x g; 5 min; 4 °C), as células foram lavadas duas vezes com uma solução tampão fosfato-salino (pH 7,4) e foram ressuspensas no mesmo tampão para acerto da absorvância (600 nm) a 0,8 ± 0,01 por espectrofotometria, obtendo-se uma concentração final de 10<sup>8</sup> ufc/mL.

Paralelamente as monocamadas de células Caco-2 presentes em cada poço das placas, foram lavadas duas vezes com 3 mL de uma solução tampão fosfato-salino (pH 7,0). Seguidamente foram adicionados 2 mL de meio RPMI 1640 GlutaMax isento de soro fetal de bovino e de antibióticos e antes de se proceder à inoculação da

cultura bacteriana, as placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera humidificada com 5 % de CO<sub>2</sub> / 95 % de ar, durante 1 h. Após este período, as suspensões bacterianas com uma concentração celular de 10<sup>8</sup> ufc/mL foram centrifugadas (5000 x g; 5 min; 4 °C) e as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 GlutaMax, isento de soro fetal de bovino e de antibióticos. Seguidamente cada um dos poços contendo as células Caco-2 foram inoculados com 1 mL da suspensão bacteriana resultante e procedeu-se à sua co-incubação a 37 °C em atmosfera com 5 % de CO<sub>2</sub> / 95% de ar durante 2 h. Após este período o meio foi removido, as monocamadas foram lavadas 3 vezes com 1 mL de uma solução tampão fosfato-salino (pH 7,0) e as células foram removidas por tripsinização usando uma solução 0,05 % (v/v) de Tripsina-EDTA durante aproximadamente 15 min à temperatura ambiente. Das suspensões resultantes foram efectuadas diluições seriadas e posterior plaqueamento em MRS agar para determinar a quantidade de células bacterianas que aderiram às células Caco-2. Foram também efectuadas contagens das células bacterianas adicionadas previamente em cada poço.

A eficiência da aderência foi expressa em percentagem e definida como a razão entre a concentração de bactérias viáveis que permaneceram aderidas às células Caco-2 e a concentração de bactérias viáveis colocadas em cada poço.

**Nota:** Foram efectuados três ensaios independentes para cada isolado em estudo.

### **3.2.2.3 Avaliação da actividade antagonista relativamente a bactérias patogénicas**

A actividade antimicrobiana dos diferentes isolados de *Lactobacillus* spp. em estudo foi testada em relação a um grupo de bactérias patogénicas: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*. Para tal, o sobrenadante das culturas dos isolados foi testado pelo método de difusão em agar – método semi-quantitativo recorrendo aos métodos adaptados de Gu *et al.*, 2008 e Guo *et al.*, 2010.

Foram utilizados os sobrenadantes após a centrifugação (5000 x g; 5 min; 4 °C) de 10 mL de cultura em caldo MRS com 16 h de crescimento de cada isolado de *Lactobacillus* spp. em estudo. Antes de se proceder à avaliação da sua capacidade antimicrobiana, estes foram concentrados por liofilização, posteriormente foram ressuspensos em 2 mL de solução tampão fosfato-salino (pH 7) para anular o efeito inibitório dos ácidos orgânicos e foram esterilizados por filtração por membrana com 0,22 µm de porosidade.

Paralelamente foram utilizadas culturas de bactérias patogénicas, em TSB com 16 h

de crescimento. Estas foram centrifugadas (5000 x g; 5 min; 4 °C), as células foram ressuspendidas em solução tampão fosfato-salino (pH 7,0) e as suspensões celulares resultantes foram ajustadas a uma absorvância (600 nm) de  $0,5 \pm 0,01$  por espectrofotometria (correspondente a que concentração  $7 \times 10^8$  ufc/mL). Seguidamente foram inoculadas, por incorporação, em meio Mueller Hinton (Oxoid) *soft agar* (0,8 % de agar). Após solidificação do meio, foram colocados discos de papel estéreis (6,0 mm, Oxoid) na superfície da placa de Petri e estes foram impregnados com 8 µL dos sobrenadantes desprovidos de células. As placas foram mantidas em repouso durante algumas horas, de modo a que os sobrenadantes se pudessem difundir no agar e posteriormente foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Após este período, o diâmetro dos halos de inibição produzidos correspondentes à actividade antagonista foi medido com a ajuda de uma craveira.

Adicionalmente, para confirmar a natureza proteica do composto com actividade antimicrobiana presente nos sobrenadantes foi avaliada a sua resistência à acção de uma enzima proteolítica através dos métodos adaptados de Van Reenen *et al.*, 1998. Assim, os sobrenadantes desprovidos de células foram submetidos à acção da proteinase K (1 mg/mL, Sigma) durante 2 h a 37 °C. Após este período, a enzima foi inactivada termicamente (5 min a 100 °C) e testou-se a actividade antagonista dos sobrenadantes relativamente às diferentes bactérias patogénicas por medição de absorvância (600 nm) em microplacas de 96 poços. Os controlos positivos foram efectuados com os sobrenadantes desprovidos de células sem o tratamento enzimático.

**Nota:** Foram efectuados três ensaios independentes para cada bactéria patogénica e cada sobrenadante foi testado em triplicado.

### 3.2.3 Análise estatística dos resultados

A Análise Estatística dos dados foi realizada com recurso ao programa informático Statistica versão 8.0, recorrendo-se à Análise de Variância (ANOVA) a um factor com aplicação do teste de Tukey, com um intervalo de confiança de 95 %, de modo a determinar a existência de diferenças significativas entre as médias dos resultados obtidos para as estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona ao natural para os critérios de selecção de novas estirpes probióticas testados.

### 3.3 Resultados e Discussão

#### 3.3.1 Critérios de selecção de estirpes probióticas relativos à segurança

##### 3.3.1.1 Avaliação da patogenicidade

Na avaliação da patogenicidade de novas estirpes probióticas, a actividade hemolítica e mucolítica são as propriedades mais estudadas.

A actividade hemolítica está relacionada com a patogenicidade das estirpes que demonstrem possuir capacidade de produzir hemolisina (exotoxina) provocando a lise dos eritrócitos. A produção de hemolisina permite aos microrganismos adquirir iões ferro, causando anemia e edema no hospedeiro (Vesterlund *et al.*, 2007). O ferro é um micronutriente que actua como co-factor em várias reacções e é necessário para o crescimento de alguns microrganismos (Hussain, 2008). Os lactobacilos estão descritos como uma excepção, uma vez que o ferro não constitui uma necessidade para o seu crescimento; tal facto é considerado uma vantagem ecológica no seu ambiente natural onde competem com patogénios (Elli *et al.*, 2000). Contudo, estudos demonstraram que existem algumas estirpes de *Lactobacillus* spp. produtoras de hemolisina (Maragkoudakis *et al.*, 2006; Baumgartner *et al.*, 1998). De acordo com Elli *et al.* (2000) este comportamento pode estar relacionado com a necessidade de iões ferro de algumas estirpes probióticas para o metabolismo de purina e pirimidina num ambiente com limitações específicas de nucleótidos. Assim, é essencial ter em conta a actividade hemolítica nos critérios de selecção de novas estirpes probióticas.

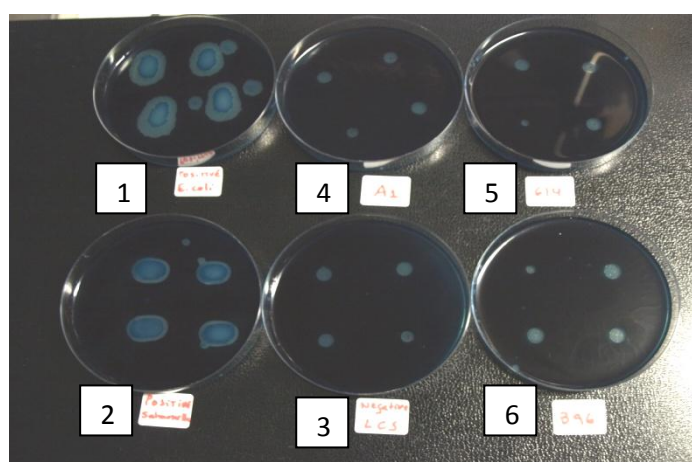
Foi efectuada a avaliação da produção de hemolisina pelas estirpes de *Lactobacillus* spp isoladas e verificou-se que nenhuma, incluindo a estirpe controlo, causou a lise dos eritrócitos de sangue de cavalo presentes no meio de cultura ( $\gamma$ - hemólise). A lise completa ( $\beta$ -hemólise) foi verificada apenas na reacção da estirpe de *Staphylococcus aureus* usada como controlo positivo. Estes resultados estão de acordo com os reportados por Bautista-Gallego *et al.* (2013) e por Argyri *et al.* (2013) para estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona fermentada.

A camada de muco (mucina) que reveste a superfície do tracto gastrointestinal desempenha um papel importante no sistema de barreira da mucosa. Alterações no conteúdo ou estrutura do muco podem comprometer as funções de protecção da mucosa. Ao longo de todo o tracto gastrointestinal existem inúmeras células glandulares polarizadas do tipo mucoso que segregam mucina que se dissolve na

água formando o muco. Essa camada de muco fornece protecção contra moléculas estranhas e microrganismos patogénicos actuando, ao mesmo tempo, como lubrificante para a motilidade intestinal.

A produção de enzimas que degradam a mucina tem sido relatada como um factor de virulência para alguns enteropatogénios, nomeadamente, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio cholera*, *Shigella* spp., *Helicobacter pylori* e *Yersinia enterocolitica* (Colina *et al.*, 1996). Desta forma, é possível que um microrganismo com a capacidade de degradar a mucina não só tenha o potencial de invadir o hospedeiro, como também de facilitar a penetração de outros patogénios e agentes tóxicos. Assim, a avaliação da capacidade de degradação da mucina constitui um indicador de segurança aquando da avaliação do potencial probiótico de novas estirpes (Zhou *et al.*, 2001).

Foi avaliada a actividade mucolítica dos isolados e verificou-se que nenhum causou degradação da mucina presente no meio de cultura demonstrando ser incapazes de degradar, *in vitro*, a mucina gastrointestinal. Por outro lado, as estirpes de *E. coli* e *S. Typhimurium* usadas como controlo positivo apresentaram zonas claras em torno das colónias indicando assim que estas possuem capacidade de provocar degradação da mucina (Fig. 7). Considerando que a degradação extensiva da mucina facilita a translocação das bactérias para os nódulos linfáticos mesentéricos e outros órgãos ou tecidos (Sriphochanart e Skolpap, 2010), os resultados obtidos sugerem que as estirpes testadas são não-invasivas da mucosa do tecido intestinal e estão de acordo com reportado por Zhou *et al.* (2001) onde também testaram estirpes de *Lactobacillus* spp. potencialmente probióticas.



**Figura 7.** Avaliação da actividade mucolítica: **(1)** reacção da estirpe de *E. coli* (controlo positivo); **(2)** reacção da estirpe de *S. Typhimurium* (controlo positivo); **(3)** reacção da estirpe probiótica de referência (controlo negativo); **(4)** reacção da estirpe *L. paraplantarum* A1 **(5)** reacção da estirpe *L. plantarum* 614 **(6)** reacção da estirpe *L. pentosus* B96.

### 3.3.1.2 Avaliação da resistência a antibióticos

O estudo da resistência aos antibióticos das bactérias lácticas do género *Lactobacillus* é muito importante devido à sua associação aos alimentos e à possibilidade de serem usadas como probióticos (Biourge *et al.*, 1998). A administração de bactérias portadoras de genes de resistência a antibióticos capazes de os transferir horizontalmente para bactérias presentes no intestino constitui uma ameaça à saúde humana e animal porque dá origem à resistência e à disseminação em populações bacterianas normalmente sensíveis e consequentemente leva ao fracasso das terapias antibacterianas (Salminen *et al.*, 1998). Assim, o estudo do perfil de resistência a antibióticos das estirpes com potencial acção probiótica é crucial para a avaliação da sua segurança.

Para avaliar a resistência de estirpes *Lactobacillus* spp., o painel da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar para aditivos e produtos ou substâncias utilizados na alimentação animal (FEEDAP) definiu valores de *cut-off* para determinados antibióticos e para algumas espécies ou grupos fermentativos do referido género. Estes valores foram obtidos a partir de investigações publicadas, da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), de programas de controlo nacionais e europeus e são revistos regularmente e modificados assim que sejam publicados novos dados relevantes.

Na Tabela 2 estão presentes os valores de CMI dos isolados em estudo para antibióticos de diferentes grupos: inibidores da síntese da parede celular (ampicilina e vancomicina) e inibidores da síntese proteica (canamicina, estreptomicina, tetraciclina, gentamicina, eritromicina e cloranfenicol).

As estirpes de *L. plantarum* 614, *L. paraplantarum* A1 e *L. pentosus* B96 isoladas de azeitona ao natural, bem como a estirpe probiótica de referência *L. casei* Shirota demonstraram ser sensíveis aos antibióticos ampicilina, tetraciclina, eritromicina e cloranfenicol, uma vez que os valores de CMI verificados são iguais ou inferiores aos valores de *cut-off* reportados pela EFSA (2012) para estas espécies. Estes resultados estão concordantes com os publicados por D'Aimmo *et al.* (2007) e Liasi *et al.* (2009). Por outro lado, todas as estirpes testadas demonstraram possuir resistência aos antibióticos canamicina, gentamicina, estreptomicina e a vancomicina, uma vez que os valores das CMIs verificados são superiores aos valores de *cut-off* reportados pela EFSA (2012) para as suas espécies. Tal como Bernardeau *et al.* (2008) e Coppola *et al.* (2005) reportaram, o género *Lactobacillus* apresenta, de um modo geral, resistência intrínseca aos aminoglicosídeos (canamicina, gentamicina e estreptomicina) uma vez



que não possui cadeia transportadora de electrões que medeia a entrada desta classe de antibióticos na célula, bem como resistência intrínseca à vancomicina já que apresenta D-Ala-D-lactato no seu peptidoglicano em vez do dipeptídeo D-Ala-D-Ala que constitui o alvo de ligação deste antibiótico. Deste modo, os resultados obtidos indicam que as resistências apresentadas pelos isolados de *Lactobacillus* spp. em estudo a estes antibióticos são de natureza intrínseca, estando codificadas no cromossoma e por essa razão não ocorre o risco de serem transferidas horizontalmente. Deste modo, a administração de estirpes probióticas intrinsecamente resistentes a antibióticos pode contribuir para a manutenção e o restabelecimento da microbiota intestinal em pacientes submetidos a uma antibioterapia (Salminen *et al.*, 1998). Adicionalmente, a origem vegetal das estirpes em estudo detém o pressuposto de não haver contacto com antibióticos podendo explicar a resistência registada, interpretada como uma característica intrínseca, constituindo assim uma vantagem em relação às estirpes de origem animal ou humana.

**Tabela 2-** Valores de CMI (µg/mL) de alguns antibióticos para as estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural

Estirpe	CMI (µg/mL)							
	Ampicilina	Vancomicina	Gentamicina	Canamicina	Eritromicina	Tetraciclina	Cloranfenicol	Estreptomicina
<i>L. plantarum</i> <b>614</b>	< 2	≥ 1024 <sup>R</sup>	512 <sup>R</sup>	≥ 1024 <sup>R</sup>	< 2	16	4	≥ 1024 <sup>R</sup>
<i>L. paraplantarum</i> <b>A1</b>	< 2	≥ 1024 <sup>R</sup>	512 <sup>R</sup>	≥ 1024 <sup>R</sup>	< 2	8	4	≥ 1024 <sup>R</sup>
<i>L. pentosus</i> <b>B96</b>	< 2	≥ 1024 <sup>R</sup>	1024 <sup>R</sup>	≥ 1024 <sup>R</sup>	< 2	16	4	≥ 1024 <sup>R</sup>
<i>L. casei</i> Shirota	< 2	≥ 1024 <sup>R</sup>	1024 <sup>R</sup>	≥ 1024 <sup>R</sup>	< 2	4	4	1024 <sup>R</sup>

<sup>R</sup> Resistente de acordo com os valores de *cut-off* da EFSA (EFSA, 2012)

### 3.3.2 Critérios de selecção de estirpes probióticas relativos à funcionalidade

#### 3.3.2.1 Resistência ao processo digestivo simulado

Os microrganismos probióticos incorporados em alimentos devem ser capazes de sobreviver à passagem pelo tracto gastrointestinal e posteriormente colonizar o intestino para que possam desempenhar as suas funções benéficas no hospedeiro.

O ensaio efectuado teve como objectivo avaliar a resistência dos isolados às condições do tracto gastrointestinal humano simuladas *in vitro*. Para tal, o processo de digestão foi simulado de uma forma contínua e sequencial e foram considerados os factores mais relevantes para a sobrevivência de uma estirpe probiótica durante a passagem pelo tracto gastrointestinal: o efeito da lisozima, a influência do ácido com a

pepsina (*stress* gástrico) e o posteriormente a acção dos sais biliares e da pancreatina (*stress* gastrointestinal).

De um modo geral, os resultados obtidos (Tabela 3) revelam que a lisozima não teve um efeito pronunciado na viabilidade dos isolados (G2). A exposição das suspensões celulares à diminuição do pH 5,0 (G3), 4,1 (G4) e 3,0 (G5) causou uma pequena mas progressiva redução na sua viabilidade. Por outro lado, quando foram submetidas a pH 2,1 (G6) e pH 1,8 (G7), todas as estirpes mostraram uma redução acentuada da sua viabilidade (3 a 4 log ufc/mL) demonstrando possuir uma grande sensibilidade aos baixos valores de pH testados. Estes resultados sugerem que o esvaziamento gástrico (pH <3,0) poderá proporcionar passagens de doses muito baixas de bactérias viáveis para o intestino. Por este motivo, para avaliar a tolerância dos isolados às condições presentes no intestino foram retiradas alíquotas apenas das etapas G3, G4 e G5 onde foram submetidas a um tratamento com 0,45% (m/v) de sais biliares e 0,1% (m/v) de pancreatina.

Verificou-se também que, de um modo geral, todos os isolados em estudo (concentração inicial de  $10^9$  ufc/mL) demonstraram possuir capacidade de sobreviver, sem se multiplicar, durante o processo digestivo simulado atingindo uma concentração final igual entre  $10^8$  e  $10^9$  ufc/mL (excepto no caso da estirpe *L. pentosus* B96 cuja concentração se apresentou igual ou superior a  $10^6$  ufc/mL). A sobrevivência dos isolados em estudo ao processo digestivo simulado demonstrou ser superior ao reportado por Bautista-Gallego *et al.* (2003) para isolados de azeitona fermentada, correspondentes às mesmas espécies.

**Tabela 3.** Viabilidade celular (log ufc/mL) das estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural nas diferentes etapas do processo digestivo simulado *in vitro*. (Médias  $\pm$  desvio padrão com letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as etapas do processo digestivo para a mesma estirpe de *Lactobacillus* spp. pelo teste de Tukey a 0,05 %; Médias  $\pm$  desvio padrão com letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as estirpe de *Lactobacillus* spp. para a mesma etapa do processo digestivo, pelo teste de Tukey a 0,05 %)

Estirpe	Etapas da digestão simulada (log ufc/mL)									
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	GI3	GI4	GI5
<i>L. plantarum</i> 614	9,469 $\pm$ 0,149 a,A	9,270 $\pm$ 0,006 a,b,A	9,236 $\pm$ 0,055 a,b,A	8,909 $\pm$ 0,015 b,A	8,910 $\pm$ 0,076 b,A	7,145 $\pm$ 0,072 c,A	5,797 $\pm$ 0,187 d,A	9,135 $\pm$ 0,004 a,b,A	9,215 $\pm$ 0,138 a,b,A,B	9,110 $\pm$ 0,074 a,b,A
<i>L. paraplantarum</i> A1	9,402 $\pm$ 0,018 a,A	9,457 $\pm$ 0,030 a,B	9,499 $\pm$ 0,003 a,A	9,517 $\pm$ 0,064 a,B	9,448 $\pm$ 0,070 a,B	7,494 $\pm$ 0,025 b,A	0,000 $\pm$ 0,000 c,B	9,528 $\pm$ 0,077 a,B	9,572 $\pm$ 0,090 a,B	9,425 $\pm$ 0,044 a,A
<i>L. pentosus</i> B96	9,451 $\pm$ 0,155 a,A	9,432 $\pm$ 0,018 a,B	9,470 $\pm$ 0,111 a,A	9,441 $\pm$ 0,047 a,B	9,197 $\pm$ 0,060 a,B,C	6,033 $\pm$ 0,284 b,B	0,000 $\pm$ 0,000 c,B	7,207 $\pm$ 0,054 d,C	6,545 $\pm$ 0,287 b,d,C	6,886 $\pm$ 0,723 b,d,B
<i>L. casei</i> Shirota	9,473 $\pm$ 0,122 a,A	8,934 $\pm$ 0,027 a,C	8,924 $\pm$ 0,083 a,B	8,913 $\pm$ 0,039 a,A	8,929 $\pm$ 0,074 a,A	5,740 $\pm$ 0,083 b,B	3,442 $\pm$ 0,671 c,C	8,746 $\pm$ 0,080 a,D	8,573 $\pm$ 0,279 a,B	8,581 $\pm$ 0,196 a,A

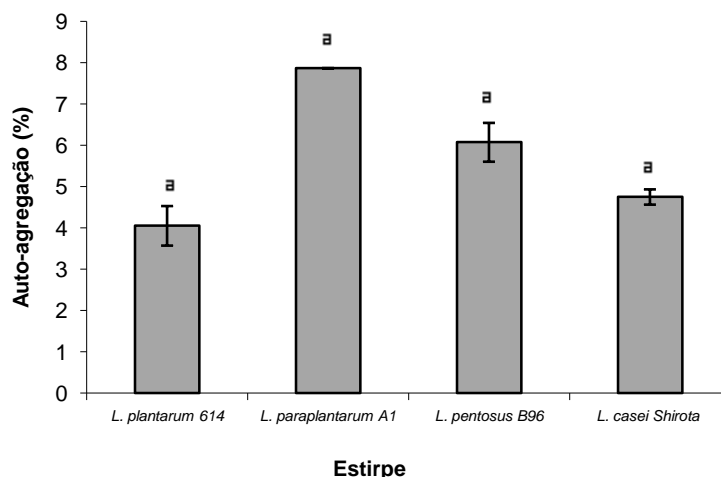
### **3.3.2.2 Avaliação da capacidade de colonização e aderência às células do epitélio intestinal**

#### **Estudo das propriedades de auto-agregação, co-agregação e hidrofobicidade**

A interacção dos microrganismos probióticos com a microbiota intestinal natural é a chave para o potencial sucesso do organismo em termos de colonização e persistência no intestino a longo prazo constituindo um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra agentes patogénicos (Del Re *et al.*, 2000).

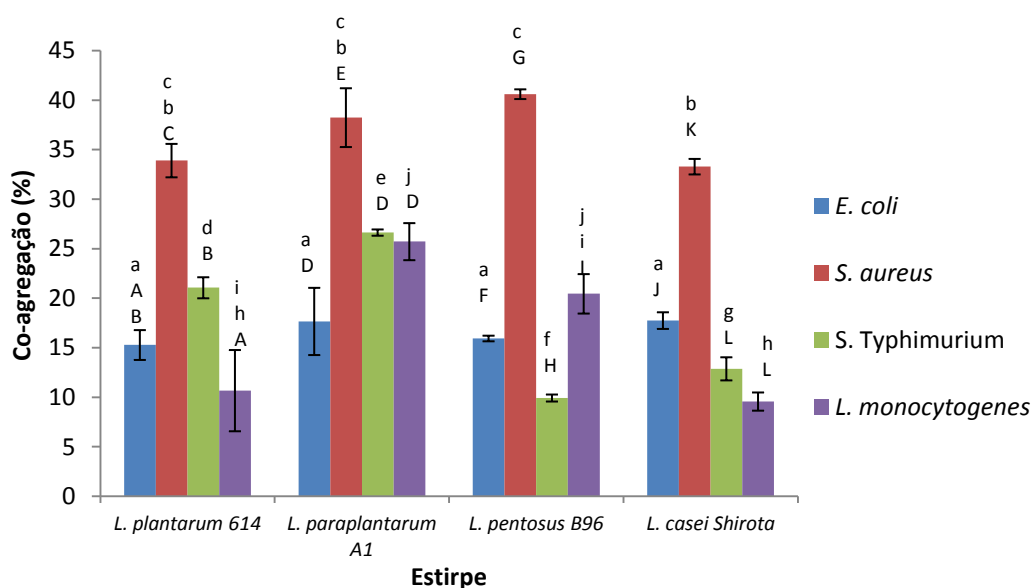
A auto-agregação traduz-se na capacidade de agregação entre si de microrganismos da mesma espécie, enquanto a co-agregação é definida como a capacidade de microrganismos de espécies diferentes realizarem o mesmo mecanismo. Wadstrom *et al.* (1987) relacionaram as propriedades de auto-agregação e co-agregação dos microrganismos probióticos com a capacidade de colonização do epitélio intestinal e de formação de barreiras contra agentes patogénicos. Adicionalmente, as propriedades físico-químicas da superfície celular microbiana, tal como a hidrofobicidade, também estão fortemente relacionadas com o mecanismo de aderência às células do epitélio intestinal (Kos *et al.*, 2003).

Foi avaliada a capacidade de auto-agregação dos isolados em estudo e verificou-se que estes apresentaram um comportamento variável com percentagens de auto-agregação entre 4,0 e 6,0 %, no entanto não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) (Fig. 8). Contudo, os resultados obtidos são inferiores aos indicados como aceitáveis para uma estirpe probiótica ( $> 40\%$ ) tal como foi recomendado por Del Re *et al.* (1998) embora tenham sido superiores à estirpe de referência. A estirpe que apresentou uma percentagem de auto-agregação mais elevada foi *L. paraplantarum* A1 demonstrando que poderá possuir uma maior facilidade de colonização nas células do intestino. Os resultados obtidos diferem dos reportados por Todorov *et al.* (2008) para outros lactobacilos. Estas diferenças de resultados podem estar relacionadas com componentes específicos da superfície celular dependentes da origem da estirpe (Klayraung *et al.*, 2008; Ecmekci *et al.*, 2009).



**Figura 8.** Auto-agregação (%) de estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural, avaliada ao fim de 2 h. (Médias  $\pm$  desvio padrão com letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey a 0,05 %).

Bactérias do género *Lactobacillus* que possuem a capacidade de se agregarem com agentes patogénios são de interesse especial no que diz respeito a potenciais propriedades probióticas, uma vez que este parece ser um mecanismo de prevenção da aderência de agentes patogénicos ao epitélio intestinal do hospedeiro (Del Re *et al.*, 2000). Adicionalmente, alguns autores sugerem que os probióticos podem co-agregar com bactérias patogénicas e controlar o seu crescimento através da produção de compostos antimicrobianos, nomeadamente o ácido láctico e as bacteriocinas (Iñiguez-Palomares *et al.*, 2007). Assim, devido ao facto da co-agregação ser reconhecida como um mecanismo importante na manutenção da microbiota intestinal não infecciosa (Reid *et al.*, 1988), avaliou-se a capacidade de co-agregação dos isolados em estudo com algumas bactérias patogénicas. Os resultados obtidos (Fig. 9) sugerem que determinadas estirpes de *Lactobacillus* spp. testadas podem constituir um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra alguns agentes patogénicos, como é o caso da estirpe *L. paraplantarum* A1 que demonstrou possuir uma elevada percentagem de co-agregação com todos os patogénios testados ( $\geq 20\%$ ). Da análise dos resultados verificou-se que *S. aureus* possui a melhor capacidade de co-agregar com todas as estirpes de *Lactobacillus* spp. em estudo ( $\geq 30\%$ ). Em suma, todas as estirpes de *Lactobacillus* spp. em estudo demonstraram possuir capacidade de co-agregar com as diferentes bactérias patogénicas testadas, no entanto os resultados sugerem que a mesma depende tanto da estirpe de *Lactobacillus* spp. como do agente patogénico em questão, tal como foi demonstrado por Collado *et al.* (2008).

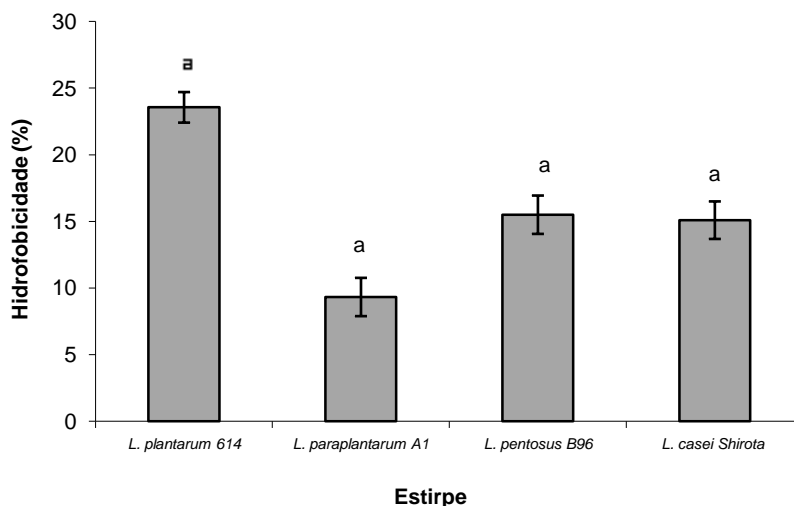


**Figura 9.** Co-agregação (%) de estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural com agentes patogênicos, avaliada ao fim de 4 h. (Médias  $\pm$  desvio padrão com letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os agentes patogênicos para a mesma estirpe de *Lactobacillus* spp. pelo teste de Tukey a 0,05 %; Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as estirpes de *Lactobacillus* spp. para o mesmo agente patogênico pelo teste de Tukey a 0,05 %)

As interações entre os microrganismos e as células do hospedeiro não são específicas, contudo alguns estudos têm demonstrado que, para algumas estirpes probióticas, existe uma co-relação entre a hidrofobicidade da superfície celular bacteriana e a capacidade de aderência à mucosa intestinal (Pelletier *et al.*, 1997). Contudo, Schillinger *et al.* (2005) reportaram que a hidrofobicidade pode intervir no processo de aderência, mas não constitui um pré-requisito para a mesma.

Estudos prévios sobre as propriedades físico-químicas das superfícies celulares microbianas demonstraram que a presença de glicoproteínas na superfície celular resulta numa elevada hidrofobicidade enquanto uma superfície hidrofílica está associada à presença de polissacarídeos (Kos *et al.*, 2003). A avaliação da hidrofobicidade da superfície celular dos isolados em estudo foi efectuada com base na sua capacidade de aderência bacteriana ao hidrocarboneto testado (xileno). Analisando os resultados obtidos (Fig. 10), verifica-se que as percentagens de hidrofobicidade variaram entre 9,3 e 23,5 %, no entanto não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as estirpes. Destaca-se a estirpe *L. plantarum* 614 uma vez que apresentou a percentagem de hidrofobicidade mais elevada, sendo mesmo superior à estirpe de referência. As percentagens obtidas demonstraram ser

superiores às reportadas por Bautista-Gallego *et al.* (2013) para outras estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona fermentada.



**Figura 10.** Hidrofobicidade (%) de estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural (Médias  $\pm$  desvio padrão com letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey a 0,05 %).

Em suma, os resultados obtidos sugerem que as estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona ao natural, apesar de pertencerem a espécies diferentes, possuem propriedades preditivas de colonização e aderência ao epitélio intestinal semelhantes ( $p > 0,05$ ).

#### **Avaliação da capacidade de aderência aos enterócitos Caco-2**

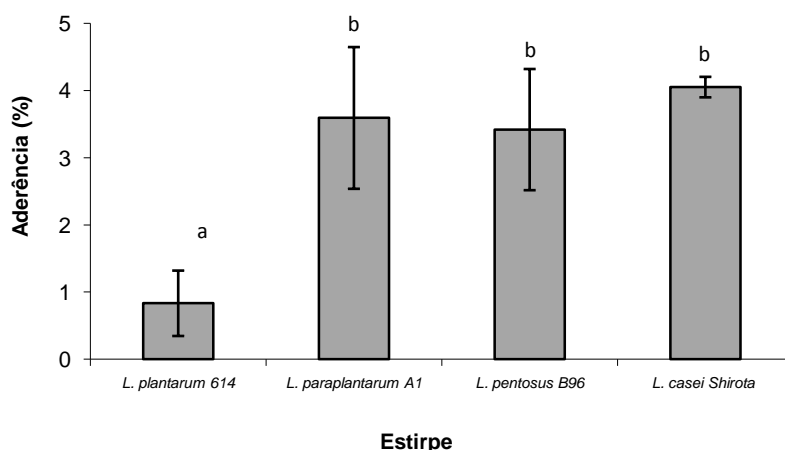
A capacidade dos microrganismos aderirem às células do epitélio intestinal é considerada um dos principais critérios na selecção relativos à funcionalidade de novas estirpes probióticas, uma vez que a aderência prolonga a sua permanência no intestino permitindo exercer os efeitos benéficos no hospedeiro. A prevalência dos microrganismos probióticos no intestino dificulta a aderência de agentes patogénicos por exclusão competitiva ou antagonismo directo (Apostolou *et al.*, 2001).

No ensaio realizado pretendeu-se avaliar a capacidade de aderência, *in vitro*, dos isolados às células Caco-2. A eficiência da aderência foi calculada através da razão entre o número de bactérias viáveis que permaneceram aderidas aos enterócitos Caco-2 e o número de bactérias viáveis inoculadas na monocamada de células.

As estirpes *L. paraplantarum* A1 e *L. pentosus* B96 apresentaram percentagens de aderência às células Caco-2 semelhantes à estirpe probiótica de referência, ao

contrário da estirpe *L. plantarum* 614 que apresentou uma capacidade de aderência significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) (Fig. 11). Comparando estes resultados com os obtidos para a hidrofobicidade, verifica-se que as interações hidrofóbicas não predominam no processo de aderência desta estirpe, sugerindo que esta adere às células Caco-2 maioritariamente por forças de *Van der Waals* e electrostáticas (Daeschel e McGuire, 1998). As percentagens de aderência obtidas são, no geral, ligeiramente inferiores às publicadas anteriormente por Agyri *et al.* (2013) para a aderência de diferentes estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona fermentada às células Caco-2 (30-74 %). No entanto, é importante salientar que os níveis de aderência obtidos não são rigorosamente comparáveis com estes autores devido às diferenças na metodologia usada. A maior parte dos modelos usados para aderência de bactérias probióticas às células Caco-2 *in vitro* representam simplificações das condições *in vivo* e portanto têm um valor preditivo algo limitado, pelo que não deverá efectuar-se uma extrapolação dos resultados de um sistema *in vitro* para um sistema *in vivo*.

Futuramente, poderá ser efectuada a caracterização bioquímica dos factores da superfície bacteriana que estão envolvidos na capacidade de aderência.



**Figura 11.** Aderência (%) de estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural às células Caco-2 (Médias  $\pm$  desvio padrão com letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey a 0,05 %).

### 3.3.2.3 Avaliação da actividade antagonista reactivamente a bactérias patogénicas

Um dos mecanismos mediados pelos probióticos para prevenir a colonização de patogénios, bem como manter o balanço da microbiota intestinal, é a produção de

substâncias antimicrobianas, tais como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogénio (Servin, 2004). Este papel de protecção contra patógenos gastrointestinais e os seus mecanismos subjacentes têm vindo a receber uma especial atenção no estudo de probióticos e têm sido utilizados como critério de selecção de novas estirpes para uso humano.

A avaliação da actividade antagonista de estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona ao natural foi efectuada relativamente a estirpes de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus* pelo método de difusão em agar (Tabela 4). Após a incubação das bactérias patogénicas durante 24 h, na presença do sobrenadante de culturas das estirpes de *Lactobacillus* spp., verificou-se a existência de diferentes níveis de inibição, incluindo ausência total em alguns casos. Os sobrenadantes das estirpes *L. paraplantarum* A1 e *L. plantarum* 614 demonstraram possuir um espectro de actividade tanto para bactérias Gram-positivas como Gram-negativas. De um modo geral, as estirpes de *Escherichia coli* e *Salmonella* Typhimurium demonstraram maior sensibilidade (halo de inibição > 3 mm) aos sobrenadantes testados. Estes resultados estão de acordo com Obadina *et al.* (2006) que reportaram um amplo espectro de actividade antimicrobiana, nomeadamente contra *S. Typhimurium*, *E. coli* e *S. aureus*, numa fermentação envolvendo *L. plantarum*.

**Tabela 4.** Actividade antagonista de estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona (cv. *Galega vulgar* preta) ao natural relativamente a bactérias patogénicas

Estirpes- sobrenadantes	Bactérias patogénicas			
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>L. plantarum</i> 614	+	++	+	+
<i>L. paraplantarum</i> A1	+	++	++	+
<i>L. pentosus</i> B96	-	++	+	-
<i>L. casei</i> Shirota	-	++	+	-

(-) Ausência de halo de inibição; (+) halo de 1-3 mm; (++) halo superior a 3 mm

Na tabela 5 encontram-se as percentagens de sobrevivência das bactérias patogénicas, avaliadas por espectrofotometria, quando colocados em contacto com os sobrenadantes de estirpes de *Lactobacillus* spp. em estudo, com e sem proteinase K. Verificou-se que os patógenos testados apresentaram percentagens de sobrevivência mais elevadas na presença de sobrenadante submetido ao tratamento com proteinase K. Estes resultados sugerem que o composto com actividade antimicrobiana presente no sobrenadante poderá ser de natureza proteica, indicando que a proteinase K poderá ter exercido uma acção proteolítica no mesmo, diminuindo assim a sua actividade.



Em suma, os resultados obtidos indiciam que as estirpes de *Lactobacillus* spp. estudadas possuem capacidade de reduzir a incidência das bactérias patogénicas testados, podendo actuar tanto no próprio alimento (nomeadamente azeitona), bem como no intestino do hospedeiro, após a sua ingestão e colonização.

**Tabela 5.** Sobrevivência (%) de bactérias patogénicas na presença dos sobrenadantes de estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural com e sem proteinase K (Médias  $\pm$  desvio padrão com letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre a actividade antimicrobiana do sobrenadante da mesma estirpe de *Lactobacillus* spp, com e sem proteinase K, para a mesma bactéria patogénica pelo teste de Tukey a 0,05 %; Médias  $\pm$  desvio padrão com letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre a actividade antimicrobiana do sobrenadante das estirpes de *Lactobacillus* spp. com o mesmo tratamento para a mesma bactéria patogénica pelo teste de Tukey a 0,05 %).

Estirpes-sobrenadantes	Proteinase K	% Sobrevivência de bactérias patogénicas			
		<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>L. plantarum</i> 614	+	36,6 $\pm$ 5,4 a,A	40,5 $\pm$ 4,7 a,A	38,6 $\pm$ 1,3 a,A,B	41,4 $\pm$ 1,7 a, A
	-	13,5 $\pm$ 0,0 b, A	13,5 $\pm$ 0,3 b,A	15,6 $\pm$ 0,4 b,A	15,3 $\pm$ 1,5 b,A
<i>L. paraplantarum</i> A1	+	27,9 $\pm$ 1,0 a,B	32,8 $\pm$ 0,1 a,A	32,3 $\pm$ 6,1 a,B	26,9 $\pm$ 0,4 a,B
	-	13,5 $\pm$ 0,3 b,A	15,4 $\pm$ 1,1 b,A	15,9 $\pm$ 0,0 b,A	10,9 $\pm$ 0,4 b,A
<i>L. pentosus</i> B96	+	46,0 $\pm$ 1,5 a,C	48,5 $\pm$ 2,1 a,A	46,5 $\pm$ 0,3 a,A	45,1 $\pm$ 2,4 a,A
	-	17,2 $\pm$ 2,0 b,B	18,9 $\pm$ 0,4 b,A	16,3 $\pm$ 0,6 b,A	22,1 $\pm$ 4,2 b,B
<i>L. casei</i> Shirota	+	41,9 $\pm$ 7,0 a,A,C	39,4 $\pm$ 6,6 a,A	44,7 $\pm$ 2,5 a,A	46,2 $\pm$ 5,3 a ,A
	-	22,5 $\pm$ 1,2 b,C	18,0 $\pm$ 0,3 b,A	16,6 $\pm$ 0,6 b,A	20,3 $\pm$ 5,9 b,B

(+) com proteinase K; (-) sem proteinase K

### 3.4 Balanço intercalar

Este estudo permite observar que a hipótese formulada é verificada para as três estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural.

#### **4 Preparação de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural com adição de culturas adjuntas de *Lactobacillus* spp. potencialmente probióticas**

**Hipótese:** É possível adicionar culturas adjuntas de *Lactobacillus* spp. potencialmente probióticas ao meio fermentativo de azeitona ao natural, tornando-a num alimento funcional não alterando as características sensoriais intrínsecas deste produto.

##### **4.1 Material Biológico**

###### **4.1.1 Material Vegetal**

Foram utilizados frutos maduros da cv. *Galega vulgar* (Fig. 12) colhidos na campanha de 2012 (Novembro) gentilmente cedidos por uma unidade industrial localizada em Envendos, cujo principal olival abastecedor se situa na região de Castelo Branco. Estes foram lavados e classificados, utilizando-se azeitonas de categoria I (NP- 3034, 2012) para as actividades experimentais.



**Figura 12.** Lote de azeitona da cv. *Galega vulgar*

###### **4.1.2 Culturas de *Lactobacillus* spp. com potencial probiótico**

As estirpes *L. plantarum* 614, *L. paraplantarum* A1 e *L. pentosus* B96 isoladas de azeitona da cv. *Galega vulgar* ao natural e com potencial probiótico previamente estudado, encontravam-se conservadas a - 80 °C em glicerol (80 %, v/v). A reactivação das estirpes foi conseguida através de dupla cultura em caldo MRS (pH 6,2) suplementado com 4 % (m/v) de NaCl, incubadas a 37 °C, em aerobiose, durante 20 e 16 h, respectivamente, permitindo assim uma adaptação das bactérias ao meio salino. Após o segundo período de incubação, as culturas foram centrifugadas (5000 x g; 10 min; 4 °C) e ressuspendidas em água destilada estéril.

##### **4.2 Delineamento experimental**

No pós-colheita, 65 kg de fruto foram colocados em fermentadores de 80 L de capacidade e cobertos com 30 L de água adicionada de sal, que no equilíbrio atingiu

cerca de 3 % (m/v), iniciando-se assim uma fermentação natural e espontânea levada a cabo pela microbiota autóctone dos frutos e do meio. Esta etapa de fermentação decorreu na unidade industrial à temperatura ambiente, sujeita a oscilações térmicas inerentes às condições meteorológicas.

Posteriormente os frutos foram subdivididos, 15 kg de azeitona com 7,5 L da respectiva água de cobertura, por fermentadores de 20 L de capacidade. Procedeu-se à inoculação de cada fermentador, com 2 % (v/v) das culturas adjuntas de *Lactobacillus* spp. seleccionadas (Perricone *et al.*, 2010) com uma concentração celular final de  $10^8$  ufc/mL. Foi efectuada uma fermentação controlo, sem adição de cultura adjunta, levada a cabo apenas pela microbiota autóctone dos frutos.

Assim, resultaram quatro processos fermentativos independentes, designados por:

- **F614**: fermentação com a adição da estirpe *Lactobacillus plantarum* 614;
- **FA1**: fermentação com a adição da estirpe *Lactobacillus paraplantarum* A1;
- **FB96**: fermentação com a adição da estirpe *Lactobacillus pentosus* B96;
- **FC**: Fermentação apenas com microbiota autóctone (controlo).

As fermentações decorreram em laboratório durante 75 dias à temperatura ambiente, e durante esse período, efectuaram-se adições sucessivas de NaCl até atingir 6 % (m/v) (teor mínimo recomendado pela NP-3034 (2012) para azeitonas ao natural) e uma adição de 3 g/L de glucose.

Ao longo dos 75 dias foram recolhidas amostras de 5 mL de salmoura da zona central de cada fermentador, em intervalos de tempo regulares, de forma a acompanhar a evolução dos perfis microbiológico e físico-químico do meio fermentativo. Os resultados utilizados de cada colheita correspondem ao valor médio de dois fermentadores submetidos ao mesmo tratamento.

#### **4.3 Controlo analítico da salmoura de fermentação de azeitona ao natural**

Em azeitona de mesa, o estudo da evolução da fermentação inclui a análise integrada da evolução da microbiota característica (*Enterobacteriaceae*, bactérias lácticas e leveduras) e de parâmetros físico-químicos, nomeadamente, o pH, a acidez total e a concentração de NaCl (Sánchez *et al.*, 2000; Chammem *et al.*, 2005).

##### **4.3.1 Análises microbiológicas**

As análises microbiológicas foram efectuadas na salmoura uma vez que, segundo Fernandez-Diez *et al.* (1985), os microrganismos aderidos à película do fruto encontram-se na salmoura de fermentação em proporção semelhante e recorreu-se aos métodos adaptados de Pintado *et al.*, (2006). Assim, foram inoculadas em meio

selectivo, alíquotas das diluições sucessivas de salmoura em água peptonada e, após incubação, contaram-se as respectivas células viáveis (unidades formadoras de colónias por mL). A quantificação de colónias de *Enterobacteriaceae* foi efectuada após crescimento a 37 °C durante 24 h em VRBD agar (Merck), de leveduras em YGC (Merck) após incubação a 25 °C durante 72 h e de bactérias lácticas totais em MRS agar com 0,02 % (m/v) de azida de sódio (Sigma-Aldrich) após incubação a 37 °C durante 48 h. A azida de sódio foi utilizada pela sua capacidade de inibir alguns sistemas enzimáticos de transporte de electrões como a catalase e a citocromo C oxidase (Domig *et al.*, 2003). Sendo característica das bactérias lácticas a ausência destes sistemas (Axelsson, 1993), o seu crescimento não é afectado pela presença, nos meios de cultura, deste composto que consegue ser eficaz na eliminação de muitas bactérias aeróbias, Gram-negativas, leveduras e bolores (Potes e Marinho, 2007).

#### **4.3.2 Análises físico-químicas**

Os parâmetros físico-químicos analisados na salmoura foram o pH, a acidez total (expressa em percentagem de ácido láctico, m/v) e o teor de NaCl (expresso em percentagem, m/v). Estes parâmetros foram analisados recorrendo aos métodos de Fernandez-Diez *et al.*, (1985).

##### **Determinação do pH**

O pH foi determinado por potenciometria em potenciómetro (CRISON, Micro pH 2002) previamente calibrado a 20 °C, com soluções tampão de pH 4 e pH 7. As determinações foram realizadas em triplicado.

##### **Determinação da Acidez Total**

A acidez total de amostras de 10 mL de salmoura foi efectuada por titulação com uma solução padronizada de NaOH (0,2 N), utilizando uma solução alcoólica de fenolftaleína a 1 % (m/v) como indicador. Os resultados foram expressos em percentagem de ácido láctico, através do factor de conversão em ácido láctico, recorrendo à equação 4.

$$\text{Acidez total (\%, m/v)} = 0,9 \times N \times V \quad (\text{Eq. 4})$$

Sendo N a normalidade da solução de NaOH e V o volume de NaOH (mL) gasto na titulação. Foram efectuados triplicados de cada amostra e determinações de acidez total em duplicado.

## Determinação do teor de NaCl

A determinação do teor de NaCl foi efectuada por titulação com uma solução padronizada de  $\text{AgNO}_3$  (0,1 N), utilizando como indicador o cromato de potássio a 5% (m/v). A amostra sofreu uma diluição de 5:100 em água destilada tendo sido retirada uma alíquota de 10 mL para titulação. Os cálculos foram efectuados com base na equação 5 e 6.

$$N' = (N \times V) / 0,5$$

(Eq. 5)

$$\% \text{ NaCl} = N' \times 5,845$$

(Eq. 6)

Sendo que  $N'$  corresponde aos equivalentes de cloreto de sódio na salmoura por litro;  $N$  corresponde à normalidade da solução de nitrato de prata e  $V$  corresponde ao volume da solução de nitrato de prata gasto na titulação. Os resultados foram expressos em percentagem de cloreto de sódio (m/v). Foram efectuados triplicados de cada amostra e determinações do teor em NaCl em duplicado.

### 4.4 Caracterização genotípica de bactérias lácticas isoladas da salmoura de fermentação de azeitona ao natural

Após 75 dias da adição das culturas adjuntas de *Lactobacillus* spp. com potencial probiótico ao processo fermentativo de azeitona ao natural, foi efectuada uma determinação da percentagem de correspondência das espécies isoladas relativamente às inoculadas, permitindo inferir em relação à sua taxa de implementação no fim do processo (métodos adaptados de Lavermicocca *et al.*, 2005). Assim, foram retiradas aleatoriamente 20 % das colónias presentes nas placas de MRS agar correspondentes à diluição mais elevada da colheita (cerca de 20 colónias). Estas foram purificadas, o DNA genómico foi extraído utilizando um *kit* comercial de extracção, *prepGEM* Bacteria (ZyGEM Corporation Ltd, Hamilton, New Zealand) e a sua concentração foi determinada por espectrofotometria recorrendo ao equipamento NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc, Wilmington, EUA).

A reacção de PCR foi realizada recorrendo ao método descrito por Torriani *et al.* (2001), com algumas modificações. As reacções de amplificação foram realizadas num volume final de 25  $\mu\text{L}$  contendo 1,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$  (Promega Corporation, Madison, EUA), 0,25  $\mu\text{M}$  de cada um dos *primers* paraF (5'-GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC-3'), pentF (5'-CAG TGG CGC GGT TGA TAT C-3') e pREV (5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-3'), 0,12  $\mu\text{M}$  do *primer* planF (5'-CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-3'), 12  $\mu\text{M}$  de uma mistura de trifosfatos de desoxiribonucleotídeos (dNTP), 0,5 U/ $\mu\text{L}$  da enzima Taq DNA polimerase (Promega Corporation), tampão de PCR (1 $\times$ ) (AppliChem, Darmstadt, Alemanha) e a amostra de DNA genómico (10 ng/ $\mu\text{L}$ ). As

amplificações foram efectuadas num termociclador (VWR, DOPPIO, thermal cycler 732-1210, EUA) utilizando o programa de amplificação: desnaturação inicial a 94 °C durante 3 min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C (30 s), emparelhamento ou *annealing* a 56 °C (10 s), e extensão a 72 °C (30 s), seguida de uma extensão final de 72 °C durante 5 min.

No caso do referido *multiplex*-PCR utilizaram-se os quatro *primers* paraF, pentF, pREV e planF que conduzem à amplificação dos fragmentos de 318 pb, 218 pb e 107 pb do gene *recA*, característicos de *L. plantarum*, *L. pentosus* e *L. paraplantarum*, respectivamente.

Alíquotas dos produtos amplificados (5 µL) foram separadas por electroforese em gel de agarose a 2% (m/v) (Lonza, Rockland, EUA) em tampão 1x TAE (44,5 mM Tris-Acetato-EDTA, pH 8,5) utilizando uma voltagem de 100 Volts. Os resultados obtidos foram visualizados após coloração do gel com uma solução de GelRed a 3% (v/v) (Biotium, Inc, Hayward, EUA). Os geis corados foram visualizados por um sistema de aquisição de imagem com UV (ChemiDoc XRS, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Como marcador usou-se 100 pb DNA *ladder* (Promega Corporation).

A percentagem de correspondência dos isolados de bactérias lácticas das salmouras de fermentação de azeitona ao natural da cv. *Galega vulgar* com adição de culturas adjuntas relativamente à espécie adicionada, foi calculada pela equação 7.

$\% \text{ Correspondência} = \left[ \frac{\text{n.º bandas de peso molecular correspondente à espécie adicionada}}{\text{total de bandas analisadas}} \right] \times 100$
--

(Eq. 7)

#### 4.5 Análise sensorial da azeitona

Foram analisados frutos com e sem adição das culturas adjuntas de *Lactobacillus* spp. potencialmente probióticas, pelo método adaptado de COI/OT/MO No 1/Rev. 2, (2011). Estas foram realizadas no laboratório de análise sensorial da Unidade de Ciência e Tecnologia Alimentar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária.

A análise sensorial foi realizada por um painel constituído por 5 elementos com experiência em análise sensorial de azeitona de mesa. As amostras de azeitona imersas na própria salmoura de fermentação foram apresentadas aos provadores devidamente codificadas. Cada provador analisou as amostras, de forma individual, expressando a sua impressão numa escala não estruturada de 10 cm, ancorada nos

extremos com designações quantitativas, tais como, “nenhum” e “muito”, recorrendo à folha de prova de azeitona de mesa do Conselho Oleícola Internacional adaptada (Anexo). Foram avaliados atributos gustativos (salgado, amargo, ácido) e cinestésicos (dureza, fibrosidade e crocante). Os valores numéricos atribuídos a cada atributo foram obtidos medindo a distância entre o ponto-âncora da extremidade esquerda até ao traço vertical feito pelo provador. No tratamento dos dados, calculou-se a média dos valores atribuídos por todos os provadores para cada atributo analisado.

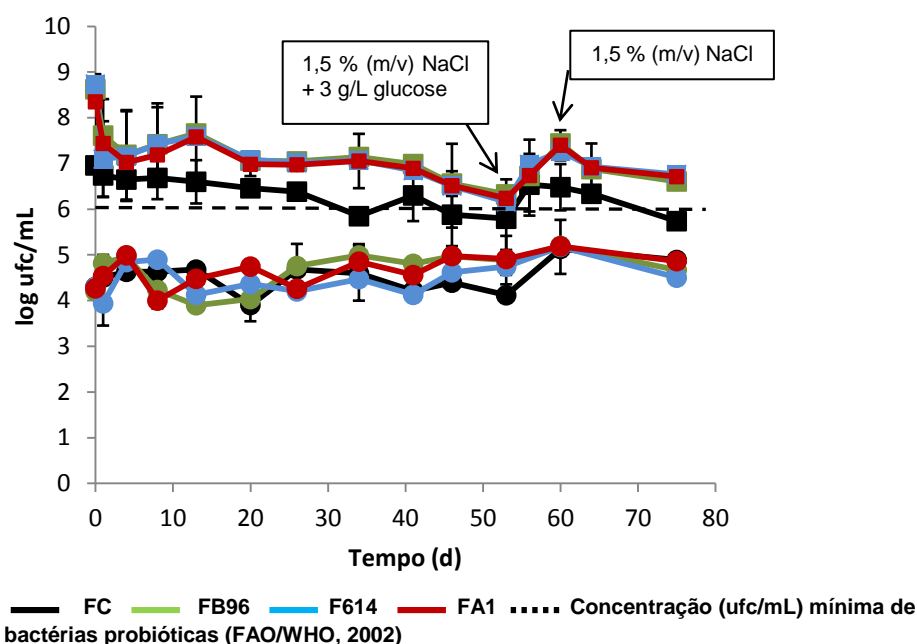
#### **4.6 Análise estatística dos resultados**

A análise estatística dos dados foi realizada com recurso ao programa informático Statistica versão 8.0, recorrendo-se à Análise de Variância (ANOVA) a um factor com aplicação do teste de Tukey, com um intervalo de confiança de 95 %, de modo a determinar a existência de diferenças significativas entre as médias dos resultados obtidos para as estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona ao natural nos parâmetros analisados. Os resultados da análise sensorial foram submetidos a uma Análise Multivariada, Análise dos Componentes Principais (ACP) e Análise *Cluster*.

## 4.7 Resultados e Discussão

### 4.7.1 Perfil microbiano das fermentações de azeitona ao natural

A figura 13 apresenta a evolução da população de bactérias lácticas e leveduras, ao longo de 75 dias. No que diz respeito à evolução da população de bactérias lácticas, verificou-se que não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as fermentações adicionadas com culturas adjuntas (FB96, F614 e FA1) contrariamente à fermentação controlo (FC).



**Figura 13.** Evolução da população de bactérias lácticas (■) e leveduras (●) ao longo do tempo, na salmoura de fermentação de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural com e sem adição de culturas adjuntas de *Lactobacillus* spp. com potencial probiótico

Após a inoculação das culturas adjuntas observou-se um decréscimo na concentração de bactérias lácticas totais, relativamente ao inóculo inicial (cerca de 1,5 log ufc/mL) durante 4 dias. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Rodriguez-Gomez *et al.*, (2013) para azeitona (cv. *Manzanilla*) processada pelo método Sevilhano inoculada com uma cultura de *L. pentosus*. A partir do 4.º dia verificou-se uma estabilização da concentração na ordem das  $10^7$  ufc/mL que se manteve até ao 40º dia altura em que houve uma diminuição de cerca de 1 log ufc/mL sugerindo um esgotamento do substrato fermentescível no meio fermentativo. No 53.º dia foi adicionado 1,5 % (m/v) de NaCl e 3 g/L de glucose e como consequência da adição de uma fonte de carbono verificou-se um aumento de 1 log ufc/mL no 56.º dia. No 60.º dia adicionou-se novamente 1,5 % (m/v) de NaCl com o objectivo de alcançar 6 % (m/v)



após o equilíbrio osmótico, verificando-se uma diminuição, seguida de uma estabilização da concentração de bactérias lácticas totais na ordem das  $10^6$  ufc/mL no 75.º dia. Esta concentração corresponde à quantidade mínima de células viáveis de bactérias probióticas que um alimento deverá conter para que os seus efeitos benéficos e a sua prevalência na composição da microbiota intestinal do hospedeiro sejam assegurados (FAO/WHO, 2002).

Tal como foi referido, no que diz respeito à fermentação usada como controlo (sem adição de cultura adjunta) verificou-se que a concentração de bactérias lácticas totais na salmoura se manteve estável entre  $10^7$  e  $10^6$  ufc/mL durante 40 dias. Com a adição de 1,5 % de NaCl e 3 g/L de glucose verificou-se um ligeiro aumento na concentração de bactérias lácticas totais (cerca de 0,5 log ufc/mL). A mesma tendência foi observada nas fermentações com adição de uma cultura adjunta. Posteriormente, a partir do 60.º dia (altura em que se adicionou novamente 1,5 % (m/v) de NaCl) a concentração de bactérias lácticas foi diminuindo gradualmente atingindo  $10^5$  ufc/mL ao fim de 75 dias. Tal como esperado neste caso, no final da fermentação, as concentrações de bactérias lácticas na fermentação controlo foram significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) às presentes nas fermentações com adição de culturas adjuntas de *Lactobacillus* spp. potencialmente probióticas.

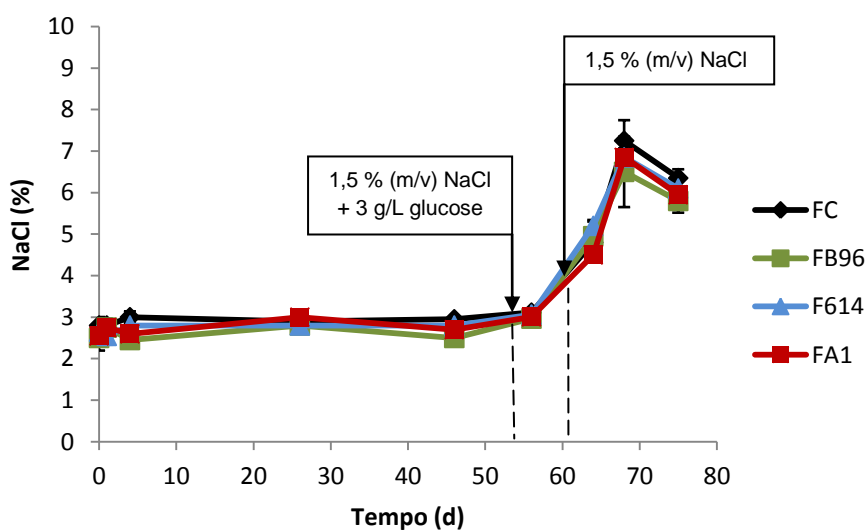
Relativamente à evolução da população de leveduras (fig. 2), ao longo de 75 dias, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as várias fermentações independentemente da adição de cultura adjunta. A população inicial encontrava-se numa concentração de aproximadamente  $10^4$  ufc/mL, aumentando cerca de 1 log ufc/mL ao fim do 4.º dia, mantendo-se na mesma ordem de grandeza ao longo dos 75 dias. Estes resultados encontram-se dentro do intervalo obtido por outros autores (Marquina *et al.*, 1992; Nisiotou *et al.*, 2009) (4 e 6 log ufc/ml), e são inferiores ao limite máximo estabelecido pelo *Codex Alimentarius* (2010), o qual indica que, dependendo da fase de fermentação, a concentração de leveduras pode ir até  $10^9$  ufc/mL. De referir também que as leveduras são importantes no processo fermentativo de azeitona, uma vez que são responsáveis pela produção de compostos voláteis e metabolitos que melhoram as características sensoriais do produto final.

Em suma, estes dois grupos de microrganismos importantes na fermentação da azeitona, bactérias lácticas e leveduras, desenvolveram-se sempre em paralelo e na proporção recomendável. Este comportamento foi registado em estudos anteriores efectuados com a cv. *Galega vulgar* (Paulino, 1997; Oliveira *et al.*, 2004).

Por fim, no que diz respeito à população de *Enterobacteriaceae*, verificou-se a sua ausência na salmoura das diferentes fermentações durante os 75 dias. Este facto coincide com a elevada população de bactérias lácticas presente ( $10^5$  -  $10^8$  ufc/mL) que, segundo Garrido-Fernandez *et al.*, (1997) são responsáveis pela produção de substâncias antimicrobianas inibidoras da referida família bacteriana durante o processo fermentativo de azeitona. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Sánchez *et al.* (2001) e Skandamis e Nychas (2003).

#### 4.7.2 Perfil físico-químico das fermentações de azeitona ao natural

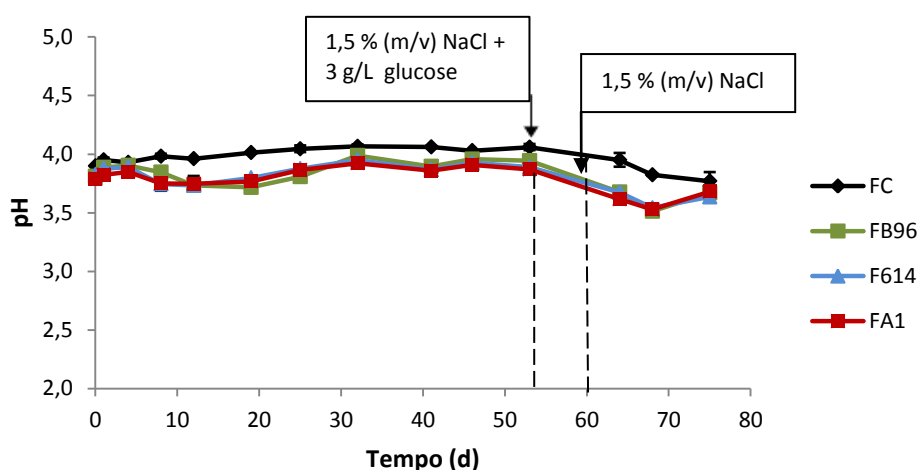
A evolução do teor de NaCl presente nas salmouras de fermentação dos diferentes fermentadores encontra-se apresentada na figura 14. Registaram-se concentrações iniciais em torno dos 3 % (m/v) que se mantiveram estáveis durante 53 dias. Após esse período, com as adições sucessivas de 1,5 % (m/v) de NaCl, no 53.º e 60.º dia, respectivamente, atingiu-se o teor de NaCl desejado, 6 % (m/v) após o equilíbrio osmótico (concentração recomendada pela NP-3034 (2012) para azeitonas ao natural).



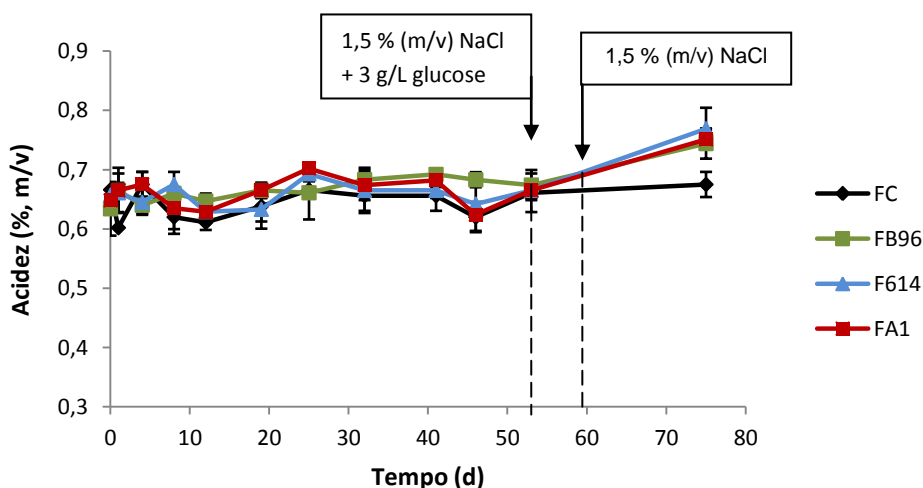
**Figura 14.** Evolução do teor de NaCl (% m/v) ao longo do tempo, na salmoura de fermentação de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural com e sem adição de culturas adjuntas de *Lactobacillus* spp. com potencial probiótico.

A evolução do pH e da acidez livre da salmoura das diferentes fermentações encontra-se apresentada nas figuras 14 e 16, respectivamente. Os valores iniciais de pH e da acidez total da salmoura das diferentes fermentações foram 3,8 e 0,6 % (m/v), respectivamente.

Durante 75 dias os referidos níveis mantiveram-se estáveis, no entanto a partir do 56.º dia o pH diminuiu ligeiramente coincidindo com as adições de NaCl e glucose onde a população de bactérias lácticas aumentou produzindo mais ácido láctico. Contudo, a adição de uma cultura adjunta não levou a uma diminuição significativa ( $p>0,05$ ) do pH na salmoura comparativamente com o controlo (apenas com a microbiota autóctone) possivelmente devido ao efeito tampão induzido pela salmoura (Garrido-Fernandez *et al.*, 1997). Os resultados obtidos estão concordantes com os obtidos por Rodriguez-Gomez *et al.* (2013) e Aponte *et al.* (2011).



**Figura 15.** Evolução do pH ao longo do tempo, na salmoura de fermentação de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural com e sem adição de culturas adjuntas de *Lactobacillus* spp. com potencial probiótico



**Figura 16.** Evolução da Acidez total (% m/v) ao longo do tempo, na salmoura de fermentação de azeitona (cv. *Galega Vulgar*) ao natural com e sem adição de culturas adjuntas de *Lactobacillus* spp. com potencial probiótico.

#### 4.7.3 Caracterização genotípica de bactérias lácticas isoladas da fermentação de azeitona ao natural

A reacção de *multiplex*-PCR desenvolvida para a amplificação dos fragmentos de 318 pb, 218 pb e 107 pb do gene *recA*, característicos de *L. plantarum*, *L. pentosus* e *L. paraplantarum*, respectivamente, permitiu confirmar a espécie adicionada aos fermentadores de azeitona.

A tabela 6 refere a percentagem de correspondência das espécies das colónias de bactérias lácticas isoladas das salmouras de fermentação de azeitona, relativamente à espécie adicionada aos fermentadores. A análise da tabela 6 permite verificar que no caso da fermentação com adição da estirpe *L. pentosus* B96, todos os isolados testados pertenciam à espécie *L. pentosus*, sugerindo que toda a população de bactérias lácticas no fim da fermentação poderá corresponder a esta espécie e que a implementação do inóculo adicionado ao processo fermentativo poderá ter sido eficaz. Em contrapartida, no caso da fermentação com adição da estirpe *L. paraplantarum* A1, nenhum dos isolados pertencia à espécie *L. paraplantarum*, sugerindo assim que a eficácia de implementação do inóculo adicionado poderá ter sido nula. A eficácia de implementação do inóculo de *L. plantarum* 614 no processo fermentativo de azeitona apresentou resultados intermédios (25 %).

Foram obtidos resultados concordantes com os apresentados pelo consórcio Grego do projecto de investigação onde se insere este trabalho, onde ao fim de 97 dias de fermentação a correspondência das colónias isoladas de um processo fermentativo de azeitona inoculado com a estirpe *L. pentosus* B281 era de 95,24 %. Contudo, foi utilizada a técnica de electroforese em campo pulsado (PFGE) para a análise dos perfis de DNA (resultados ainda não publicados).

**Tabela 6.** Percentagem de correspondência dos isolados de bactérias lácticas da salmoura de fermentação de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural com adição de culturas adjuntas relativamente à espécie adicionada.

Estirpe de <i>Lactobacillus</i> spp. adicionada	% Correspondência dos isolados relativamente à espécie adicionada (n=20)
<i>Lactobacillus pentosus</i> B96	100
<i>Lactobacillus plantarum</i> 614	25
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> A1	0

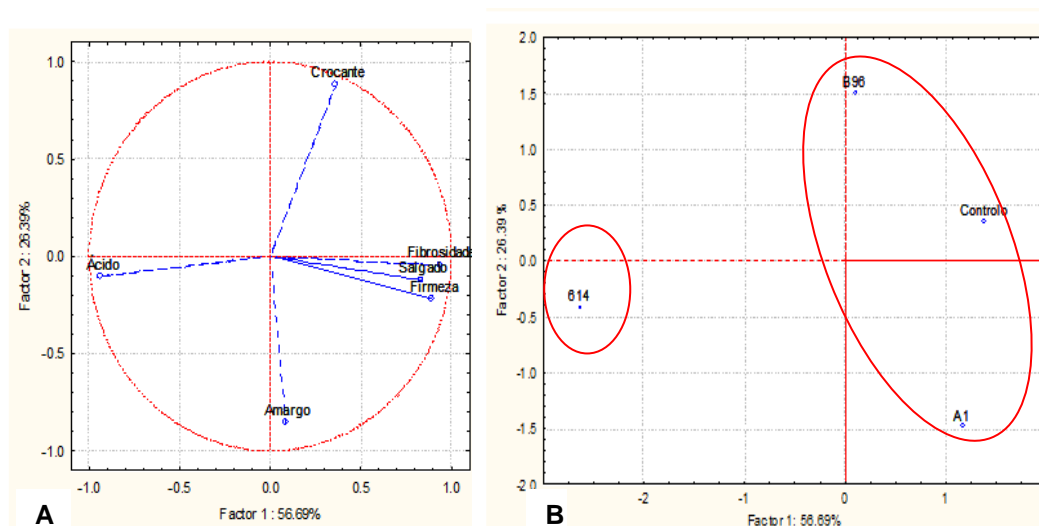
#### 4.7.4 Análise sensorial de azeitona ao natural

Os resultados da análise sensorial de azeitona ao natural, 75 dias após a adição de uma cultura adjunta de *Lactobacillus* spp. com potencial probiótico (F614, FB96 e FA1) e sem adição da mesma (FC), foram analisados tendo sido calculadas as médias e os desvios-padrão das notações atribuídas pelos provadores nos atributos analisados para cada amostra. Verificou-se pouca dispersão dos resultados, o que comprova a especialização do painel em provas de azeitona de mesa.

No sentido de tentar perceber a influência da adição de uma cultura adjunta de *Lactobacillus* spp. potencialmente probiótica a azeitona ao natural, os resultados obtidos na sua análise sensorial foram submetidos a uma análise multivariada.

As duas primeiras componentes principais explicam 83,08% da variabilidade total. Todas as variáveis, com excepção do “Amargo” e “Crocante”, estão correlacionadas com a primeira componente. A figura 17 representa as projecções dos atributos (A) e das amostras (B) no plano definido pelas duas primeiras componentes principais, respectivamente. A figura 17 (B) representa ainda (círculos) os grupos homogéneos definidos pela Análise de *Cluster*. Esta permitiu verificar que as amostras dos frutos provenientes das diferentes fermentações são muito semelhantes separando-se apenas a uma distância Euclidiana muito baixa ( $<1$ ).

A análise da figura 17 permite concluir que os frutos provenientes das fermentações FC, FB96 e FA1 estão mais associadas à fibrosidade, firmeza e sabor salgado. Em oposição os frutos provenientes da fermentação F614 estão associados ao sabor ácido. Este resultado não está inteiramente em concordância com o verificado para os valores de acidez, em que todos os frutos se revelaram semelhantes ( $p > 0,05$ ). O facto das amostras provenientes do fermentador F614 corresponderem a frutos menos firmes poderá, em parte, justificar a maior percepção do sabor ácido. A segunda componente principal permite verificar que as amostras dos fermentadores F614 e FA1 são mais associadas ao sabor amargo. Em relação à amostra de frutos proveniente do fermentador F614, a maior percepção do sabor amargo e ácido poderá indicar uma fermentação ligeiramente menos “avançada”, onde a hidrólise da oleuropeína por reacções enzimáticas, poderá não ter sido tão eficaz comparativamente com as restantes amostras de frutos.



**Figura 17.** Projecção dos atributos sensoriais (A) e das amostras de azeitona ao natural (B) no plano definido pelas duas primeiras componentes principais. (Legenda: A1- amostras de frutos provenientes dos fermentadores com adição da estirpe *L. paraplantarum* A1; 614- amostras de frutos provenientes dos fermentadores com adição da estirpe *L. plantarum* 614; B96- amostras de frutos provenientes dos fermentadores com adição da estirpe *L. pentosus* B96; C: amostra de frutos proveniente da fermentação controlo (sem adição de cultura adjunta)).

Desta forma, constatou-se que a adição de culturas das estirpes *L. pentosus* B96 e *L. paraplantarum* A1 potencialmente probióticas a azeitona ao natural não provocaram alterações sensoriais por comparação com o controlo (sem adição de cultura). Este facto mostra-se positivo uma vez que se pretende que a azeitona apenas adquira um carácter funcional, pela adição de culturas bacterianas probióticas, sem desvirtuar as suas características sensoriais. Adicionalmente, poderá verificar-se, através dos resultados obtidos na análise genotípica de bactérias lácticas isoladas dos processos fermentativos onde se verificou 100 % de correspondência com a espécie adicionada, que a estirpe *L. pentosus* B96 demonstrou um melhor desempenho nos critérios tecnológicos analisados na produção de uma azeitona potencialmente probiótica. No entanto, antes de se colocar estes frutos no mercado seria necessário efectuar uma análise de consumidor

#### 4.8 Balanço Intercalar

Este estudo permite observar que a hipótese formulada é verificada para o caso da fermentação de azeitona ao natural com adição da estirpe *L. pentosus* B96.

## 5. Estudo do efeito da embalagem e temperatura de conservação na qualidade de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural com adição de uma cultura de *Lactobacillus* spp. potencialmente probiótica

**Hipótese:** As condições de embalagem e temperatura de conservação de azeitona ao natural com adição de culturas de *Lactobacillus* spp. potencialmente probióticas são determinantes para a manutenção da viabilidade das mesmas sem alterar a qualidade do produto.

### 5.1 Material Vegetal

Foram utilizados lotes de azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural com ou sem adição de diferentes culturas de *Lactobacillus* spp. potencialmente probiótica provenientes seguintes fermentadores :

- **FB96:** fermentação com a adição da estirpe *Lactobacillus pentosus* B96;
- **F614:** fermentação com a adição da estirpe *Lactobacillus plantarum* 614
- **FA1:** fermentação com a adição da estirpe *Lactobacillus paraplantarum* A1;
- **FC:** Fermentação apenas com microbiota autóctone (controlo).

Os frutos foram retirados dos respectivos fermentadores, seleccionados manualmente no sentido de remover os frutos não uniformes ou com defeitos.

### 5.2 Material de embalagem

Utilizou-se um co-polímero de polipropileno e polietileno como material de embalagem e por termo soldadura (Eco-vac 40, Australia) foram efectuadas saquetas de 15 x 15 cm.

### 5.3 Delineamento experimental

Foram testadas duas modalidades de embalagem, vácuo e com adição de salmoura e duas temperaturas de conservação, 4 e 22 °C.

Azeitona em salmoura (Fig. 18): amostras com aproximadamente 75 g de frutos foram embaladas em saquetas, cobertas com 100 mL de salmoura de acondicionamento estéril com 6 % (m/v) NaCl, 0,6 % (m/v) ácido láctico e pH 4,0 (NP 3034, 2012) e seladas hermeticamente por termo soldadura. Posteriormente, as embalagens foram armazenadas às temperaturas de conservação referidas, durante 90 dias.

Azeitona sob vácuo (Fig. 19): amostras com aproximadamente 75 g de frutos foram embaladas sob vácuo em saquetas seladas hermeticamente por termo soldadura.

Posteriormente, as embalagens foram armazenadas às temperaturas de conservação referidas, durante 90 dias.



**Figura 18.** Azeitona embalada em salmoura      **Figura 19.** Azeitona embalada sob vácuo

Durante o período de conservação foram efectuadas análises, em triplicado, em intervalos de tempo definidos no que diz respeito a parâmetros microbiológicos (0, 30, 45, 60, 75 e 90 dias), físico-químicos (0 e 90 dias) e sensoriais (90 dias).

#### **5.4 Controlo analítico de azeitona ao natural, embalada sob vácuo e em salmoura e conservada a 4°C e 22 °C**

##### **5.4.1 Análises Microbiológicas**

As análises microbiológicas dos frutos foram efectuadas recorrendo aos métodos adaptados de Panagou, 2004. Assim, pesaram-se  $10 \pm 0,1$  g de azeitona descaroçada num saco de *stomacher* estéril (*Seward*, Reino Unido) e adicionaram-se 90 ml de solução de Ringer, respeitando os cuidados de assépsia recomendados na realização de análises microbiológicas. Homogeneizou-se a amostra em *Stomacher* (*Stomacher-400*, *Seward*, UK) a 260 rpm durante 2 minutos e obteve-se assim a suspensão inicial (diluição  $10^{-1}$ ). Seguidamente efectuaram-se diluições decimais seriadas desta suspensão em água peptonada e procedeu-se à inoculação de 1,0 ou 0,1 mL das diluições apropriadas por incorporação ou sementeira à superfície, respectivamente, em meios apropriados para quantificação de bactérias lácticas, leveduras e *Enterobacteriaceae*. Assim, para a contagem de bactérias lácticas, semeou-se por incorporação 1 mL de cada diluição pretendida em MRS agar com azida de sódio (0,02 %, m/v) e as placas de Petri foram incubadas a 37 °C durante 48 h; para a contagem de leveduras, 0,1 mL de cada diluição pretendida foram semeados à superfície em placas de YGC agar (Merck) e incubou-se a 25 °C durante 48 h; para a contagem de *Enterobacteriaceae*, semeou-se por incorporação 1 mL de cada diluição pretendida em VRBD agar (Merck) e as placas foram incubadas a 37 °C durante 48 h.



#### 5.4.2 Análises Físico-Químicas

Os parâmetros físico-químicos analisados dos frutos foram o pH, a acidez total (expressa em percentagem de ácido láctico, m/v) e o teor de NaCl (expresso em percentagem, m/v).

##### Determinação do pH

O pH dos frutos foi determinado por potenciometria em potenciómetro com eléctrodo de sólidos (CRISON, Micro pH 2002) previamente calibrado a 20 °C, com soluções tampão de pH 4 e pH 7. As determinações foram realizadas em triplicado.

##### Determinação da Acidez total

A determinação da acidez total foi efectuada segundo a NP 1421 (1977) adaptada. Pesou-se 5 g ( $m_0$ ) de amostra homogeneizada (azeitona descaroçada e triturada) num frasco de Erlenmeyer, ao qual se adicionou 50 mL de água destilada (fervida e, após arrefecimento neutralizada a com solução de NaOH 0,1 N) e agitou-se. De seguida, o mesmo foi adaptado a um tubo condensador de refluxo e aqueceu-se em banho-maria durante 30 minutos. Deixou-se arrefecer, transferiu-se para um balão volumétrico de 250 mL ( $V_0$ ) e perfez-se com água destilada (recentemente fervida), homogeneizou-se e filtrou-se. Seguidamente, pipetou-se 25 mL ( $V_1$ ) do filtrado para um frasco de Erlenmeyer, a acidez total foi determinada pelo método de titulação com uma solução padronizada de NaOH (0,1 N), através da utilização de uma solução alcoólica de fenolftaleína a 1 % (m/v) como indicador e registou o volume de NaOH gasto ( $V_2$ ). A determinação da acidez foi efectuada em duplicado. O valor da acidez determinou-se recorrendo à equação 8.

$$\text{Acidez (\%, m/v)} = 100 \times (V_2/V_1) \times 0,1 \times (V_0/m_0) \quad (\text{Eq. 8})$$

Os resultados foram expressos em percentagem de ácido láctico, através do factor de conversão em ácido láctico (0,09).

##### Determinação do teor em NaCl

A determinação do teor em cloretos foi efectuada através do método volumétrico *Charpantie –Volhard* de acordo com a NP 1422 (1977). Pesou-se 5 g de amostra homogeneizada (azeitona descaroçada e triturada), realizou-se a extracção a quente e posterior precipitação por excesso de nitrato de prata, realizando-se depois a titulação desse excesso com tiocianato de potássio (0,1 N) em presença de uma solução saturada a frio de sulfato de ferro III e amónio. A determinação do teor em NaCl foi

efectuada em duplicado. Os resultados foram expressos em percentagem de cloreto de sódio, recorrendo à equação 9.

$$\text{NaCl (\%, m/v)} = [0,5844 \times (V_1 - V_2)] / m \quad (\text{Eq. 9})$$

Sendo **m** a massa da amostra expressa em gramas; **V<sub>1</sub>** o volume da solução de 0,1 N de nitrato de prata adicionado, expresso em mL; **V<sub>2</sub>** o volume da solução de 0,1 N de tiocianato de potássio, gasto na titulação, expresso em mL.

#### **5.4.3 Análise Sensorial**

A metodologia usada foi em tudo igual à descrita em 4.5. Apesar de não se ter trabalhado com um painel de consumidor, incluiu-se um parâmetro hedónico, “Intenção de Compra”, para poder inferir acerca da possível aceitação do consumidor. (A folha de prova encontra-se em Anexo.)

#### **5.4.4 Análise estatística dos resultados**

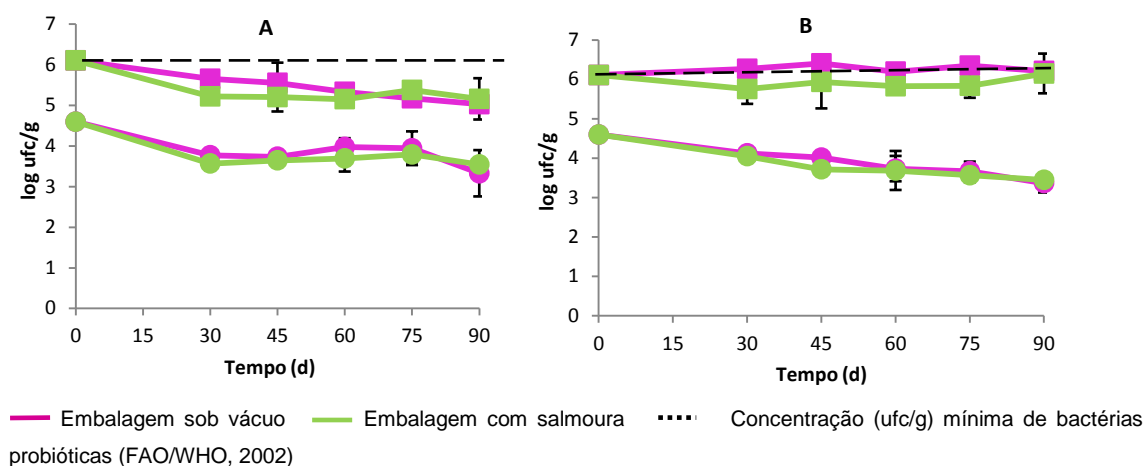
A análise estatística dos dados foi realizada com recurso ao programa informático Statistica versão 8.0, recorrendo-se a duas metodologias diferentes de análise: Análise de Variância (ANOVA) a um factor com aplicação do teste de Tukey, com um intervalo de confiança de 95%, de modo a determinar a existência de diferenças significativas entre as médias dos resultados obtidos entre as modalidades de embalagem e temperaturas de conservação nos parâmetros analisados; Análise Multivariada com Análise dos Componentes Principais (ACP) e Análise *Cluster*.

## 5.5 Resultados e Discussão

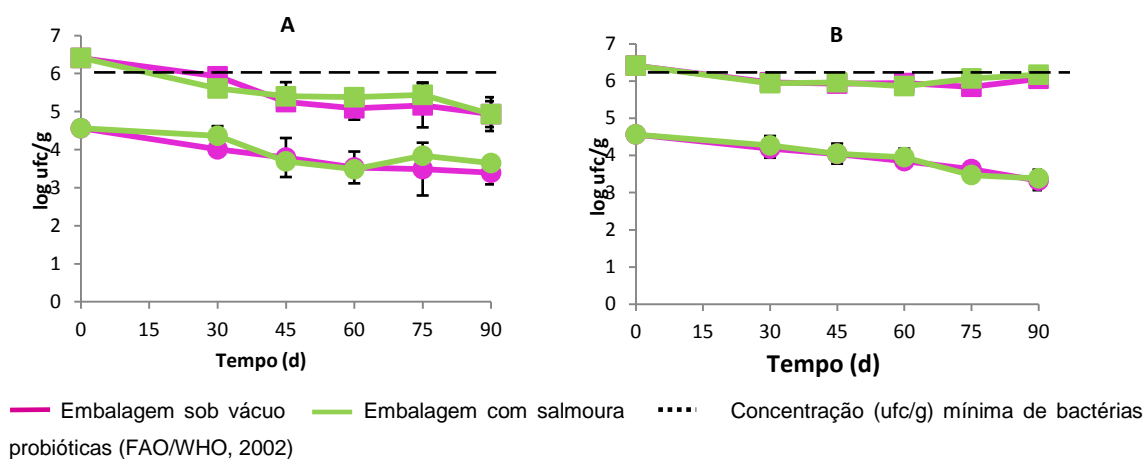
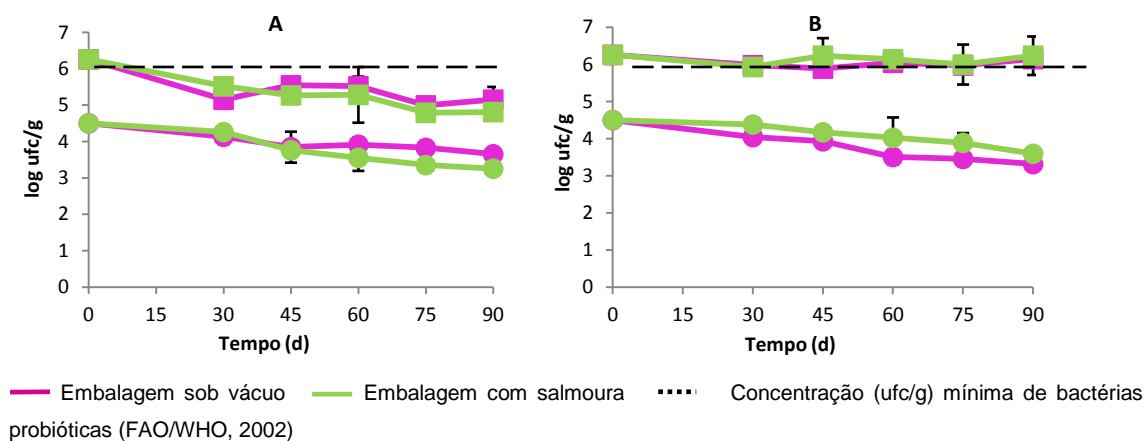
### 5.5.1 Análises Microbiológicas de azeitona ao natural

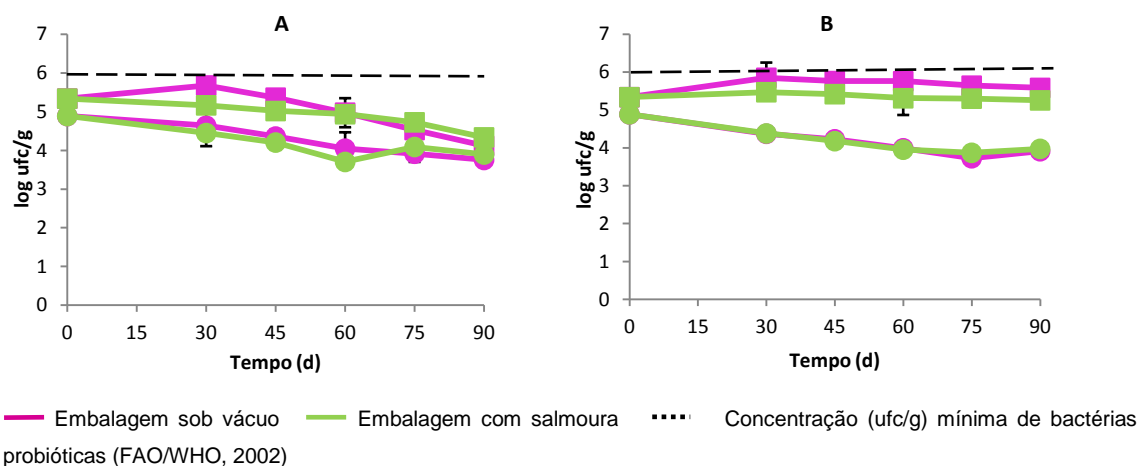
A evolução da microbiota de azeitona ao natural com adição de estirpes *Lactobacillus* spp. potencialmente probióticas embalada sob vácuo e em salmoura, e conservada a 4 °C e 22 °C, encontra-se nas figuras 20, 21 e 22. Na figura 23 está representada a evolução da microbiota em azeitona ao natural fermentada exclusivamente pela microbiota autóctone do fruto (controlo).

No momento do embalamento, a associação microbiana inicial em azeitona com adição de culturas adjuntas de *Lactobacillus* spp. potencialmente probióticas era constituída, de um modo geral, por 6 log ufc/g de bactérias lácticas totais e 4,5 log ufc/g de leveduras. Em azeitona fermentada exclusivamente pela microbiota autóctone, era constituída por 5 log ufc/g de bactérias lácticas e 4,8 log ufc/g de leveduras. Verificou-se a ausência de *Enterobacteriaceae* nos frutos provenientes das diferentes fermentações, o que está de acordo com Nychas *et al.* (2002) que reportaram que a microbiota no fim da fermentação de azeitona ao natural é constituída por bactérias lácticas e leveduras.



**Figura 20.** Evolução da população de bactérias lácticas (■) e leveduras (●) ao longo do tempo em azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural com adição de uma cultura adjunta da estirpe *Lactobacillus pentosus* B96, embalada sob vácuo e em salmoura, e conservada a 4 °C (A) e 22°C (B).





**Figura 23.** Evolução da população de bactérias lácticas (■) e leveduras (●) ao longo do tempo em azeitona (cv. *Galega vulgar*) ao natural fermentada exclusivamente pela microbiota autóctone do fruto (controlo), embalada sob vácuo e em salmoura, e conservada a 4 °C (A) e 22 °C (B).

De um modo geral, verificou-se que a população de bactérias lácticas totais presente nos frutos conservados a 22 °C se manteve sem alterações significativas ( $p > 0,05$ ), ao longo de 90 dias. Verificou-se que a concentração de bactérias lácticas totais nos frutos embalados sob vácuo se manteve ligeiramente superior, embora sem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), relativamente aos frutos embalados em salmoura. Estes resultados sugerem que as características químicas da salmoura de acondicionamento possam ter influenciado na sua sobrevivência. Por outro lado, nos frutos conservados a 4 °C verificou-se uma diminuição de cerca de 1 log ufc/g em relação à concentração inicial logo após 30 dias de armazenamento seguida de uma estabilização com níveis de  $10^5$  ufc/g durante os 60 dias seguintes, independentemente da modalidade de embalagem.

Os resultados obtidos indicam que a temperatura de conservação influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) o crescimento das bactérias lácticas ao fim de 90 dias, sugerindo que para que sejam assegurados os níveis mínimos ( $10^6$  ufc/g) de estirpes *Lactobacillus* spp. potencialmente probióticas em azeitona ao natural durante pelo menos 90 dias, esta deverá ser conservada à temperatura ambiente. Estes resultados estão de acordo com Lavermicocca *et al.* (2005) que sugerem que, considerando uma ingestão diária de 10 a 15 azeitonas (correspondente entre 30 a 50 g de polpa), poderá ser ingerida uma quantidade de bactérias probióticas viáveis entre  $10^8$  a  $10^9$  ufc presente em azeitona armazenada, durante 3 meses, à temperatura ambiente.

Comparando estes resultados com os obtidos para a viabilidade de bactérias lácticas probióticas em produtos lácteos onde a quantidade mínima para um probiótico ( $10^6$  ufc/mL) se registou aos 30 dias de armazenamento a 4 °C (Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001), verifica-se que a azeitona ao natural poderá constituir um veículo alimentar com vantagens tecnológicas para a manutenção da estabilidade e viabilidade de estirpes de bactérias lácticas probióticas por ser um produto que pode ser conservado à temperatura ambiente por longos períodos de tempo sem perder a sua qualidade.

Relativamente à população de leveduras presente nos frutos verificou-se que, de um modo geral, diminuiu 1 log ufc/g ao fim de 90 dias de conservação, independentemente da modalidade de embalagem e temperatura de conservação. Esta redução poderá dever-se ao esgotamento do substrato fermentescível nos frutos, uma vez que alguns autores reportaram que no fim da fermentação, a azeitona possui concentrações reduzidas de substrato, que é metabolizado mais rapidamente pelas bactérias lácticas do que pelas leveduras (Garcia *et al.*, 1992).

### **5.5.2 Análises Físico-químicas**

Como se pode observar pela análise da tabela 7, a maioria dos parâmetros físico-químicos estudados não apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) durante o período de conservação em questão. Nos frutos mantidos a 22 °C, os valores de pH e acidez total foram ligeiramente alterados ( $p < 0,05$ ) tendo-se registado maior acidez e consequentemente menor pH no final do período. O teor de NaCl manteve-se inalterado ( $p > 0,05$ ) independentemente da condição de embalagem e/ou temperatura de conservação.

**Tabela 7.** Parâmetros físico-químicos de azeitona (cv. *Galega Vulgar*) ao natural com e sem adição de culturas adjuntas de *Lactobacillus* spp. potencialmente probióticas, embalada sob vácuo e em salmoura após 90 dias de conservação a 4°C e 22°C. (Médias  $\pm$  desvio padrão com letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre o início (0 dias) e o fim do período de conservação (90 dias) para o mesmo parâmetro físico-químico na mesma temperatura de conservação na mesma modalidade de embalagem e no mesmo tratamento, pelo teste de Tukey a 0,05 %).

Tratamento	Embalagem	Temperatura de conservação	Tempo (dias)	pH	Acidez (% m/v)	NaCl (% m/v)
Azeitona ao natural com <i>L. pentosus</i> B96	Vácuo	4 °C	0	3,980 <sup>a</sup> $\pm$ 0,009	0,615 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007	6,000 <sup>a</sup> $\pm$ 0,028
			90	3,929 <sup>a</sup> $\pm$ 0,006	0,605 <sup>a</sup> $\pm$ 0,028	5,900 <sup>a</sup> $\pm$ 0,028
		22 °C	0	3,980 <sup>a</sup> $\pm$ 0,009	0,615 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007	6,000 <sup>a</sup> $\pm$ 0,028
			90	3,868 <sup>b</sup> $\pm$ 0,003	0,700 <sup>b</sup> $\pm$ 0,000	6,070 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007
	Salmoura	4 °C	0	3,980 <sup>a</sup> $\pm$ 0,009	0,615 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007	6,000 <sup>a</sup> $\pm$ 0,028
			90	3,963 <sup>a</sup> $\pm$ 0,008	0,610 <sup>a</sup> $\pm$ 0,000	6,200 <sup>a</sup> $\pm$ 0,000
		22 °C	0	3,980 <sup>a</sup> $\pm$ 0,015	0,615 <sup>a</sup> $\pm$ 0,028	6,000 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007
			90	3,884 <sup>b</sup> $\pm$ 0,071	0,790 <sup>b</sup> $\pm$ 0,014	6,250 <sup>a</sup> $\pm$ 0,021
Azeitona ao natural com <i>L. plantarum</i> 614	Vácuo	4 °C	0	3,945 <sup>a</sup> $\pm$ 0,015	0,640 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007	6,070 <sup>a</sup> $\pm$ 0,028
			90	3,908 <sup>a</sup> $\pm$ 0,009	0,650 <sup>a</sup> $\pm$ 0,000	6,000 <sup>a</sup> $\pm$ 0,021
		22 °C	0	3,945 <sup>a</sup> $\pm$ 0,015	0,640 <sup>a</sup> $\pm$ 0,071	6,070 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007
			90	3,851 <sup>b</sup> $\pm$ 0,002	0,720 <sup>b</sup> $\pm$ 0,015	6,100 <sup>a</sup> $\pm$ 0,021
	Salmoura	4 °C	0	3,945 <sup>a</sup> $\pm$ 0,015	0,640 <sup>a</sup> $\pm$ 0,028	6,070 <sup>a</sup> $\pm$ 0,000
			90	3,911 <sup>a</sup> $\pm$ 0,008	0,620 <sup>a</sup> $\pm$ 0,015	6,300 <sup>a</sup> $\pm$ 0,000
		22 °C	0	3,945 <sup>a</sup> $\pm$ 0,073	0,640 <sup>a</sup> $\pm$ 0,028	6,070 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007
			90	3,851 <sup>b</sup> $\pm$ 0,015	0,710 <sup>b</sup> $\pm$ 0,070	6,250 <sup>a</sup> $\pm$ 0,028
Azeitona ao natural com <i>L. paraplantarum</i> A1	Vácuo	4 °C	0	3,986 <sup>a</sup> $\pm$ 0,011	0,645 <sup>a</sup> $\pm$ 0,015	6,185 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007
			90	3,956 <sup>a</sup> $\pm$ 0,008	0,640 <sup>a</sup> $\pm$ 0,032	6,000 <sup>a</sup> $\pm$ 0,021
		22 °C	0	3,986 <sup>a</sup> $\pm$ 0,030	0,645 <sup>a</sup> $\pm$ 0,015	6,185 <sup>a</sup> $\pm$ 0,028
			90	3,828 <sup>b</sup> $\pm$ 0,007	0,760 <sup>b</sup> $\pm$ 0,010	5,900 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007
	Salmoura	4 °C	0	3,986 <sup>a</sup> $\pm$ 0,011	0,645 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007	6,185 <sup>a</sup> $\pm$ 0,000
			90	3,965 <sup>a</sup> $\pm$ 0,005	0,600 <sup>a</sup> $\pm$ 0,014	6,200 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007
		22 °C	0	3,986 <sup>a</sup> $\pm$ 0,003	0,645 <sup>a</sup> $\pm$ 0,002	6,185 <sup>a</sup> $\pm$ 0,021
			90	3,876 <sup>b</sup> $\pm$ 0,009	0,710 <sup>b</sup> $\pm$ 0,000	6,200 <sup>a</sup> $\pm$ 0,021
Azeitona ao natural (exclusivamente microbiota autóctone) - controlo	Vácuo	4 °C	0	4,146 <sup>a</sup> $\pm$ 0,018	0,540 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007	6,095 <sup>a</sup> $\pm$ 0,000
			90	4,157 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007	0,560 <sup>a</sup> $\pm$ 0,013	6,085 <sup>a</sup> $\pm$ 0,028
		22 °C	0	4,146 <sup>a</sup> $\pm$ 0,004	0,540 <sup>a</sup> $\pm$ 0,002	6,095 <sup>a</sup> $\pm$ 0,000
			90	4,092 <sup>b</sup> $\pm$ 0,015	0,590 <sup>a</sup> $\pm$ 0,012	6,005 <sup>a</sup> $\pm$ 0,021
	Salmoura	4 °C	0	4,146 <sup>a</sup> $\pm$ 0,008	0,540 <sup>a</sup> $\pm$ 0,012	6,095 <sup>a</sup> $\pm$ 0,021
			90	4,156 <sup>a</sup> $\pm$ 0,010	0,590 <sup>a</sup> $\pm$ 0,010	6,075 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007
		22 °C	0	4,146 <sup>a</sup> $\pm$ 0,011	0,540 <sup>a</sup> $\pm$ 0,006	6,095 <sup>a</sup> $\pm$ 0,000
			90	4,032 <sup>b</sup> $\pm$ 0,025	0,590 <sup>a</sup> $\pm$ 0,002	6,005 <sup>a</sup> $\pm$ 0,007

### 5.5.3 Análise Multivariada dos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e sensoriais dos frutos no final de 90 dias de conservação

Ao fim de 90 dias de conservação a diferentes temperaturas e em diferentes modalidades de embalagem, foi efectuada a análise sensorial de azeitona ao natural com e sem adição de culturas adjuntas de *Lactobacillus* spp. potencialmente probióticas.

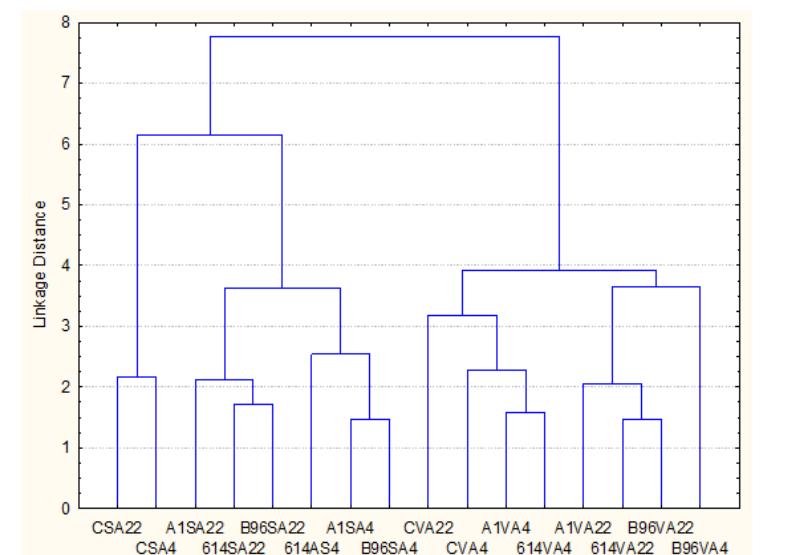
No sentido de tentar aferir a influência dos parâmetros analisados na qualidade de azeitona ao natural com e sem adição de culturas adjuntas de *Lactobacillus* spp. potencialmente probióticas, os resultados obtidos ao fim de 90 dias de armazenamento foram submetidos a uma análise multivariada. Esta análise revela que as duas primeiras componentes principais explicam 80,89 % da variabilidade total. Todas as variáveis, com excepção de “Bactérias lácticas”, “Leveduras”, “pH” e “Acidez”, estão correlacionadas com a primeira componente.

A figura 25 representa a projecção de todos os parâmetros analisados (A) e das amostras (B) no plano definido pelas duas primeiras componentes principais. Com base na projecção das amostras no plano principal e no Análise de *Cluster* (fig. 24) verifica-se a formação de dois grandes grupos baseados essencialmente na modalidade de embalagem. Através da fig. 24 verifica-se que a uma distância euclidiana de 8, a modalidade de embalagem demonstrou ser determinante na separação das amostras. Adicionalmente verificou-se que a adição de culturas adjuntas potencialmente probióticas separa as amostras a uma distância euclidiana de 3,5 e a temperatura de conservação a uma distância euclidiana de 1,5.

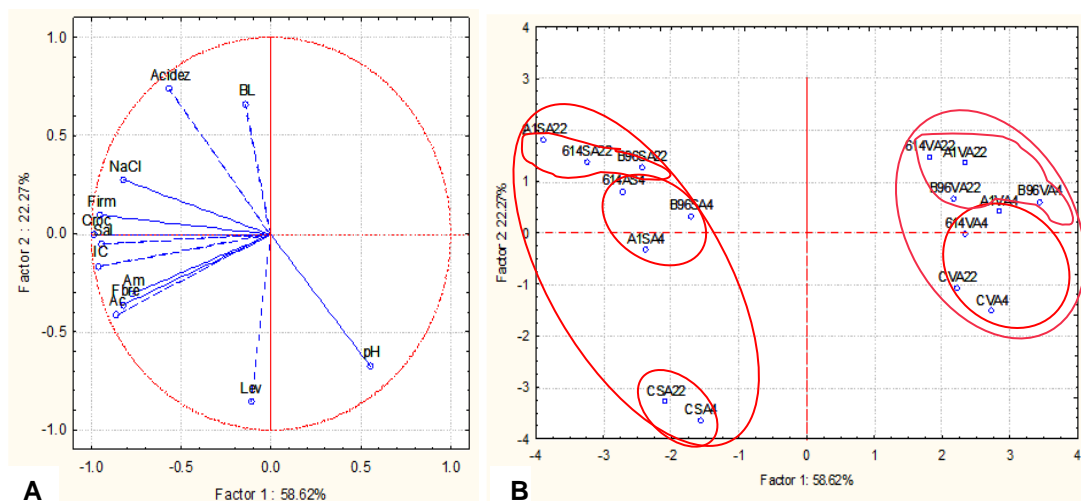
A análise da figura 24 permite concluir que os frutos embalados em salmoura estão mais associados aos atributos sensoriais, parâmetros microbiológicos e físico-químicos. Em oposição aos frutos embalados sob vácuo, que se encontram em quadrantes opostos, evidenciando uma menor “associação” aos diferentes parâmetros. De realçar que o parâmetro hedónico, “Intenção de Compra”, se dissociou dos frutos embalados sob vácuo.

A análise multivariada permite concluir que a embalagem sob vácuo não será a mais indicada para este tipo de produto. Este facto prende-se mais com características sensoriais do que tecnológicas.





**Figura 24.** Análise *Cluster* da análise multivariada a azeitona ao natural (cv. *Galega vulgar*) com e sem adição de cultura de *Lactobacillus* spp. potencialmente probiótica em diferentes modalidades de embalagem e temperaturas de conservação. Variáveis microbiológicas, físico-químicas e sensoriais. (**Legenda:** A1- amostras de frutos provenientes dos fermentadores com adição da estirpe *L. paraplantarum* A1; 614- amostras de frutos provenientes dos fermentadores com adição da estirpe *L. plantarum* 614; B96- amostras de frutos provenientes dos fermentadores com adição da estirpe *L. pentosus* B96; C: amostra de frutos proveniente da fermentação controlo (sem adição de cultura adjunta); SA: embalagem em salmoura; VA: embalagem sob vácuo; número à direita: temperatura de conservação (4°C e 22°C)).



**Figura 25.** Projecção dos parâmetros analisados (A) e das amostras de azeitona ao natural (cv. *Galega vulgar*) (B) no plano definido pelas duas primeiras componentes principais. (**Legenda (A):** BL: bactérias lácticas; Lev: Leveduras; Firm: Firmeza; Cro: Crocante; Fibro: Fibrosidade; Sal: Sabor salgado; Am: Sabor amargo; Ac: Sabor ácido; IC: Intenção de compra. **Legenda (B):** A1- amostras de frutos provenientes dos fermentadores com adição da estirpe *L. paraplantarum* A1; 614- amostras de frutos provenientes dos fermentadores com adição da estirpe *L. plantarum* 614; B96- amostras de frutos provenientes dos fermentadores com adição da estirpe *L. pentosus* B96; C: amostra de frutos proveniente da fermentação controlo (sem adição de cultura adjunta); SA: embalagem em salmoura; VA: embalagem sob vácuo; número à direita: temperatura de conservação (4°C e 22°C)).

#### IV - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

- O presente estudo permitiu concluir que as estirpes *L. pentosus* B96, *L. plantarum* 614 e *L. paraplantarum* A1 isoladas de azeitona ao natural possuem aptidão probiótica, apresentando resultados similares ou, em alguns casos, até mesmo mais promissores relativamente à estirpe de referência *L. casei* Shirota nos critérios de selecção *in vitro* de novas estirpes probióticas recomendados pela FAO/WHO. Contudo, para serem assumidas como estirpes probióticas, além dos vários testes efectuados, terão de ser confirmados os seus efeitos benéficos na saúde do consumidor após elaboração de ensaios *in vivo*.
- A adição de bactérias lácticas potencialmente probióticas, como culturas adjuntas e não com o objectivo de iniciar a fermentação (culturas *starter*) revelou ser tecnologicamente viável.
- A adição de culturas adjuntas potencialmente probióticas proporcionou uma concentração de bactérias lácticas totais superior ( $10^6$  ufc/g) à registada na fermentação controlo (exclusivamente fermentada pela microbiota autóctone) ( $10^5$  ufc/g) ao fim de 75 dias de fermentação. Estes resultados sugerem que a azeitona ao natural constitui um bom veículo biológico para as estirpes adicionadas que, para além de possuírem um potencial probiótico, demonstraram possuir propriedades tecnológicas tais como: tolerância a elevados níveis de sal e baixo pH, resistência ao efeito antimicrobiano dos compostos fenólicos e sobrevivência na presença de estirpes da microbiota indígena pertencentes à mesma espécie.
- As análises genotípicas efectuadas a bactérias lácticas isoladas das salmouras na fase final da fermentação permitiram inferir quanto à eficácia de implementação das estirpes adicionadas. Os resultados obtidos são apenas indicativos e sugerem que a estirpe *L. pentosus* B96 demonstrou possuir uma melhor eficácia de implementação na fermentação de azeitona ao natural. No entanto, o método molecular utilizado não permitiu identificar os isolados em relação à estirpe. Assim, futuramente poderá utilizar-se o método mais discriminatório e reprodutível para diferenciar as várias estirpes de *Lactobacillus* spp., a técnica *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE). Esta técnica permite a comparação de fragmentos longos de DNA após a digestão com uma enzima de restrição. Ou em alternativa, os isolados poderão ser sujeitos a uma caracterização molecular que define a sua variabilidade intraespecífica, que poderá ser efectuada através de rep-PCR (Gevers *et al.*, 2001; Svec *et al.*, 2005).
- A análise sensorial efectuada aos frutos com adição de culturas de *Lactobacillus* spp. potencialmente probióticas, efectuada no fim da fermentação permitiu concluir

que a adição das estirpes *L. pentosus* B96 e *L. paraplantarum* A1 não provocou alterações sensoriais comparativamente aos frutos provenientes de uma fermentação efectuada exclusivamente pela microbiota autóctone (controlo).

- A análise dos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e sensoriais dos frutos embalados em diferentes modalidades de embalagem (saquetas sob vácuo e em salmoura) e temperaturas de conservação (4 e 22 °C), permitiu concluir que, ao fim de 90 dias, o produto registou uma quantidade satisfatória ( $10^6$  ufc/g) de bactérias lácticas quando armazenado a 22 °C, independentemente da modalidade de embalagem ( $p > 0,05$ ) e que a temperatura de conservação influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) o valor de pH e a acidez total. De referir que foi efectuada uma quantificação de bactérias lácticas totais e que futuramente deverá efectuar-se uma quantificação das estirpes de bactérias lácticas adicionadas ao produto.
- No que diz respeito à análise sensorial efectuada aos frutos embalados nas diferentes modalidades e conservados a diferentes temperaturas, os resultados permitiram concluir que a modalidade de embalagem demonstrou ser determinante na avaliação sensorial. Relativamente à intenção de compra, conclui-se que os frutos embalados sob vácuo possuíam intenções de compra bastante reduzidas devido às alterações na morfologia dos frutos.
- Futuramente sugere-se que antes de se iniciar o processo fermentativo de azeitona ao natural, os frutos poderão ser esterilizados, a fim de eliminar a microbiota indígena, e poderá ser adicionada uma cultura *starter* das estirpes potencialmente probióticas estudadas com o intuito de garantir que a fermentação seja levada a cabo apenas pela cultura adicionada. De referir que a cultura *starter* deverá ser constituída não apenas por bactérias lácticas com aptidão probiótica e tecnológica, mas também por leveduras, uma vez que estas são essenciais para o desenvolvimento do *flavour* característico do produto final. Salieta-se que as análises microbiológicas e físico-químicas efectuadas durante o processo fermentativo deverão ser efectuadas não só à salmoura mas também aos frutos.

## V - BIBLIOGRAFIA

- Abe, F., Muto, M., Yaeshima, T., Iwatsuki, K. Aihara, H., Ohashi, Y., Fujisawa, T., (2010) Safety evaluation of probiotic bifidobacteria by analysis of mucin degradation activity and translocation ability. *Anaerobe*, 16:131–136.
- Ammor, M.S., Florez, A.B.; Mayo, B. (2007) Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24:559-570.
- Anderson, R. C., Cookson, A.L., McNabb, W. C., Kelly, W.J., Roy, N. C. (2010) *Lactobacillus plantarum* DSM 2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. *FEMS Microbiology Letters*. 309:184–192.
- Andrikopoulos, N. (2010) Estudios *in vivo* sobre actividad antioxidante y anticancerígena de las aceitunas de mesa. III Congreso Internacional de la Aceituna de mesa. Fundación para el Fomento y Promoción de la Aceituna de Mesa. Sanlúcar la Mayor.
- Aponte, M., Blaiotta, G., La Croce, F., Mazzaglia, A., Farina, V., Settanni, L., Moschetti, G. (2012). Use of selected autochthonous lactic acid bacteria for Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiology*, 30:8-12.
- Aponte, M., Ventrino, V., Blaiotta, G., Volpe, G., Farina, V., Avellone, G., Lanza, C. M., Moschetti, G. (2010) Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiology*, 27:162-170.
- Apostolou, E., Pelto, L., Kirjavainen, P. V., Isolauri, E., Salminen, S. J., Gibson, G. R. (2001). Differences in the gut bacterial flora of healthy and milk-hypersensitive adults, as measured by fluorescence *in situ* hybridization. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 30: 217–221.
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Kimon-Andreas, G. K., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z., Tassou, C. C. (2013) Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiology*. 33:282- 291.
- Arroyo-López, F. N., Duran-Quintana, M. C., Romero, C., Rodríguez-Gómez, F., Garrido-Fernández, A. (2007) Effect of storage process on the sugars, polyphenols, color and microbiological changes in cracked Manzanilla- Alorena table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:7434-7444.
- Arroyo-López, F.N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A. (2008) Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128:189–196.
- Axelsson LT (1993). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In "Lactic Acid Bacteria". Ed. S. Salminen, A. von Wright. Marcel Dekker Inc., 1-63
- Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. (2001) El Cultivo del Olivo. Ediciones Mundi-Prensa, 4ª Edição, Madrid (Espanha). ISBN: 84-7114-983-4.
- Baumgartner, A., Kueffer, M., Simmen, A., Grand, M. (1998) Relatedness of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from clinical specimens and such from food-stuffs, humans and technology. *Lebensm Wiss Technology*, 31: 489-494.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., Cocolin, L. (2013) Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*, 50: 135–142.
- Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S., Gueguen, M. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126: 278–285.
- Bianchi, G. (2003) Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105: 229-242.
- Biourge, V., Vallet, C., Levesque, A., Sergheraert, R., Chevalier, S., Robertom, J.-L. (1998) The use of probiotics in the diet of dogs. *Journal of Nutrition*, 128: 2730–2732.
- Cabezas, J. M. E. (2011) La aceituna de mesa: nociones sobre sus características, elaboración y cualidades. Fotomecánica e impresión: Imprenta teca, Sevilla.
- Chammem, N., Kachouri, M., Mejri, M., Peres, C., Boudabous, A., Hamdi, M. (2005) Combined effect of alkali pretreatment and sodium chloride addition on the table olive fermentation process. *Bioresour Technology*, 96:1311-1316.
- Champagne, C.P., Gardner, N.J., Roy, D. (2005) Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Review Food Science Nutrition*, 45 (1): 61-84.
- Chromarat, M., Espinouse, D. (1991) *Lactobacillus rhamnosus* septicemia in patients with prolonged aplasia receiving ceftazidime-vancomycin. *European Journal of Clinical Microbiology Infection Disease*. 10(1):44.

- Ciafardini, G., Zullo, B. A., Cioccia, G. (2005) Effect of lipase producing yeast on the oily fraction of microbiologically debittered table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107: 851–856.
- COI (2004) Conselho Oleícola Internacional RES-2/91-IV/04 Norma Comercializable Aplicable a las Aceitunas de Mesa. Madrid, Espanha.
- COI (2012) Concelho Oleícola Internacional RES-2/91-IV/04 Norma Comercializable Aplicable a las Aceitunas de Mesa. Madrid, Espanha.
- Colina, A.R., Aumont, F., Deslauriers, N., Belhumeur, P., Repentigny, L. (1996) Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infection Immunity*, 64: 4514–4519.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S. (2008) Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226: 1065–1073.
- Commanea, D., Hughes, R., Shortt, C., Rowland, I. (2005) The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutation Research*, 591: 276–289.
- Cruz, A. G., Faria, J. A. F., Van Dender, A. G. F. (2007) Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International*, 40: 951–956.
- Cruz, A.G., Antunes, A.E.C., Sousa, A.L.O.P., Faria, J.A.F., Saad, S.M.I. (2009) Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*, 42:1233–1239.
- Dabbou, S., Issaoui, M., Brahmi, F., Nakbi, A., Chehab, H., Mechri, B., Hammami, M. (2012) Changes in Volatile Compounds During Processing of Tunisian-Style Table Olives. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 89:347–354.
- Daeschel, M.A., McGuire, J. (1998). Interrelationships between Protein Surface Adsorption and Bacterial Adhesion. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 15:413–438.
- D'Aimmo, M. R., Modesto, M., Biavati, B. (2007) Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*, 115:35–42.
- D'Aimmo, M. R., Modesto, M., Biavati, B. (2007) Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 35–42.
- Damiani, P., Gobetti, M., Cossignani, L., Corsetti, A., Simonetti, M. S., Rossi, J. (1996) The sourdough microflora. Characterization of hetero- and homofermentative lactic acid bacteria, yeasts and their interactions on the basis of the volatile compounds produced. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29: 63–70.
- de Castro, A., Montañó, A., Casado, F. J., Sánchez, A. H., Rejano, L. (2002) Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology*, 19: 637–644.
- De Vuyst, L., Foulquie, M.R., Revets, H. (2003) Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in *Enterococci* of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 299–318.
- Del Re, B., Busetto, G., Vignola, G., Sgorbati, B., Palenzona, D. (1998) Autoaggregation and adhesion ability in *Bifidobacterium suis* strain. *Letters in Applied Microbiology*, 27: 307–310.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioni, M., Palenzona, D. (2000) Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 31: 438–442.
- Delgado, A., Brito, D., Peres, C., Noé-Arroyo, F., Garrido-Fernández, A. (2005) Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology*, 22: 521–528.
- Delgado, A., Catulo, L., Peres, C. M., Peres, C. (2011) Azeitona de mesa em Portugal, valor nutricional e perspectivas para novas utilizações. *Actas Portuguesas de Horticultura*, 14: 109–119.
- Domig, K. J., Mayer, H. K., Kneifel, W. (2003). Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *International Journal Food Microbiology*, 88: 165–188.
- Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljević, T., Shah, N.P. (2007)  $\alpha$ -galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. *Food Chemistry*, 70: 375–381.
- Duran-Quintana, M. C., Garcia-Garcia, P., Garrido-Fernández, A. (1999) Establishment of conditions for green table olive fermentation at low temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 51: 133–143.
- Ecmekeci H., Aslim, B., Ozturk, S. (2009). Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. *Microbiology Immunology*, 53 (2): 59–65.

- EFSA - European Food Safety Authority (2012) Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human or veterinary importance. *EFSA Journal*, 10: 27–40.
- Elli, M., Zink, R., Rytz, A., Reniero, R. & Morelli, L. (2000). Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *Journal Applied Microbiology*, 88: 695–703.
- EI-Naggar, M.Y.M.(2004) Comparative study of probiotic cultures to control the growth of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium. *Biotechnology*, 3:173–180.
- FAO/WHO, (2002) Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Disponível em: <http://ftp.fao.org/esn/food/wgreport2.pdf>
- Fernandez-Diez, M. J. (1983) "Olives" in G. Reed (ed.) *Biotechnology. A comprehensive treatise* in 8 volumes, Vol. 5. Verlog Chemie, Deerfield Beach Florida, pp. 379-397.
- Fernández-Diez, M. J., Castro, R., Garrido, A., González, F., González, F., Nosti, M., Heredia, A., Minguez, M.I., Rejano, L., Durán, M.C., Sánchez, F., García, P., de Castro, A. (1985) *Biología de la Aceituna de Mesa. Servicio de Publicaciones del CSIC*. Madrid-Sevilla.
- Garcia, P.G., Quintana, M.C.D., Balbuena, M.B., Fernandez, A.G. (1992) Lactic fermentation during storage of "Alorena" cultivar untreated green table olives. *Journal of Applied Bacteriology*, 73: 324-330.
- Garrido-Fernández, A.; Fernández Díez, M. J.; Adams, M. R. (1997) *Table Olives: Production and Processing*. London: Chapman & Hall.
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205: 31–36.
- Gomes, A., Malcata, F. X. (1999) *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus* biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 139–157.
- Gómez, A.H.S., Garcia, P.G., Navarro, L.R. (2006) Trends in table olive production, Elaboration of table olives. *Grasas y Aceites*, 57: 86-94.
- Goossens, D., Jonkers, D., Stobberingh, E., Van den Bogaard, A., Russel, M., Stockbrugger, R. (2003) Probiotics in gastroenterology: Indications and future perspectives. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 239: 15-23.
- Gu, R.-X., Yang, Z.-Q., Li, Z.-H., Chen, S.-L., Luo, Z.-L. (2008) Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. *Anaerobe*, 14:313–317.
- Guergoletto, K.B., Magnani, M., San Martin, J., Andrade, T., Garcia, S. (2010) Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 415–421.
- Guo, X.-H., Kim, J.-M., Nam, H.-M., Park, S.-Y., Kim, J.-M. (2010) Screening lactic acid bacteria from swine origins or multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*, 16: 321–326.
- Gupta, V. e Garg, R. (2009) Probiotics. *Indian Journal Medical of Microbiology*, 27(3), 202-209.
- Haller, D., Colbus, H., Ganzle, M.G., Scherenbacher, P.; Bode, C.; Hammes, W.P. (2001) Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem, a comparative *in vitro* study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Systematic and Applied Microbiology*, 24: 218–226.
- Heenan, C.N., Adamsa, M.C., Hoskena, R.W., Fleet, G.H. (2004): Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a non-fermented frozen vegetarian dessert. *LWT - Food Science and Technology* 37: 461-466.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., Córdoba, M.G. (2007) Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology*, 24: 346-351.
- Holzapfel, W.H., Wood, B.J.B. (1995) Lactic acid bacteria in contemporary perspective. The genera of Lactic acid bacteria. 1-7. Wood B.J.B., Holzapfel W.H. (eds.) Chapman & Hall. London.
- Hutkins, R. W. (2006) *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing, London.
- INE (2009). Instituto Nacional de Estatística- Estatísticas de Produção vegetal.
- INE (2011). Instituto Nacional de Estatística- Estatísticas de Produção vegetal.
- Iñiguez-Palomares, C., Pérez-Morales, R., Acedo-Félix, E. (2007) Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Revista Latinoamericana Microbiologia*, 49:46–54.
- Jiménez, A., Guillén, R., Sánchez, C., Fernández-Bolaños, J., Heredia, A. (1995) Changes in texture and cell wall polysaccharides of olive fruit during "Spanish green olive" processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:2240-2246.

- Jiménez, A., Rodríguez, R., Fernández-Caro, I., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., Heredia, A. (2000) Dietary fibre content of table olives processed under different European styles: study of physico-chemical characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1903–1908.
- Kanavouras, A., Gazouli, M., Leonidas, L. T., Petrakis, C. (2005) Evaluation of black table olives in different brines. *Grasas y Aceites*, 56: 106–115.
- Karasu, N., Simsek, O., Con, A. H. (2010) Technological and probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditionally produced fermented vegetables. *Annals of Microbiology*, 60: 227–234.
- Kirpich, I. A., Solovieva, N. V., Leikhter, S. N., Shidakova, N. A., Lebedeva, O. V., Sidorov, P. I., Bazhukova, T. A., Soloviev, A. G., Barve, S. S., McClain, C. J., Cave, M. (2008) Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol*, 42:675–682.
- Klayraung, S., Viernstein, H., Sirithunyalug, J., Okonogi, S. (2008) Probiotic properties of lactobacilli isolated from thai traditional food. *Science Pharmaceutical*, 76: 485–503.
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 981–987.
- Kuhle, A. e Jespersen, L. (2003) The Taxonomic Position of *Saccharomyces boulardii* as Evaluated by Sequence Analysis of the D1/D2 Domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Region and the Mitochondrial Cytochrome-c Oxidase II Gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 26 (4): 564–571.
- Lavermicocca P., Gobetti M., Corsetti A., Caputo L. (1998). Characterization of lactic acid bacteria isolated from olive phylloplane and table olive brines. *Italian Journal of Food Science*, 10: 27–39.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S. L., De Angelis, M., Morelli, L., Callegari, M. L., Rizzello, C. G., Visconti, A. (2005) Study of adhesion and survival of Lactobacilli and Bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 4233–4240.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S.L., Baruzzi, F., Morea, M., Gobetti, M. (2002) Olive fermentations using lactic acid bacteria isolated from olive phylloplane and olive brines. *Acta Horticulturae*, 58: 621–624.
- Lee, Y.K., Nomoto, K., Salminen, S., Gorbach, S.L. (1999) Handbook of Probiotics. John Wiley & Sons, Inc., N.Y.
- Leitão, F., Potes, M.F., Calado, M.L., Almeida, F.J. (1986) Descrição de 22 variedades de oliveira cultivadas em Portugal. *Direção Geral de Planeamento e Agricultura*. Lisboa.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (2): 67–78.
- Liasi, S. A., Azmi, T.I., Hassan, M.D., Shuhaimi, M., Rosfarizan, M., Ariff, A.B. (2009) Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, Budu. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5: 33–37.
- López-López, A., Jiménez-Araujo, A., García-García, P., Garrido-Fernández, A. (2007). Multivariate analysis for the evaluation of fiber, sugars and organic acids in commercial presentations of table olives. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 55: 10803–10811.
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B.C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*. 11: 1–17.
- Mackay A.D., Taylor M.B., Kibbler C.C., Hamilton-Miller J.M. (1999) *Lactobacillus endocarditis* caused by a probiotic organism. *Clinical Microbiology Infection*, 5: 290–292.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 189–199.
- Marín, M.L., Benito, C., Fernández, M.F., García, M.L. Selgas, M.D., Casas, C. (1997) Lactic acid bacteria: hydrophobicity and strength of attachment to meat surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 24: 14–18.
- Marquina, D., Peres, C., Caldas, F. V., Marques, J. F., Peinado, J. M., Spencer-Martins, I. (1992). Characterization of the yeast populations in olive brines. *Letters Applied Microbiology*, 14: 279–283.
- Marschan, E., Kuitunenw, M., Kukkonenw, K., Poussaz, T., Sarnesto, A., Haahtelaw, T., Korpela, R., Savilahti, E., Vaaralak, O. (2008) Probiotics in infancy induce protective immune profiles that are characteristic for chronic low-grade inflammation *Clinical and Experimental Allergy*, 38: 611–618.
- Marsilio, V., Campestre, C., Lanza, B. (2001) Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing. *Food Chemistry*, 74: 55–60.
- Marteau, P., de Vrese, M., Cellier, C.J., Schrezenmeir, J. (2001) Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *The American Journal of Clinical Nutritional*, 73, 430S–436S

- Morelli, L. (2000) *In vitro* selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, Norfolk, 1 (2): 59 – 67.
- Morelli, L. (2007). *In vitro* assessment of probiotic bacteria: from survival to functionality. *International Dairy Journal*, 17:1278-128.
- Motta, R. M., Moreira, J. L.S., Souza, M. R. (2006) Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. *BMC Biotechnology*, 6: 1-11.
- Settanni A., Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6): 691-697.
- Moura, M. R. L. (2005) Alimentos Funcionais: seus benefícios e a legislação. Disponível em: <http://acd.ufrj.br/consumo/leituras/ld.htm#leituras>.
- Mourad, Kacem e Nour-Eddine, Karam (2006) *In vitro* preselection criteria for probiotic *Lactobacillus plantarum* strains of fermented olives origin. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 1: 27-32.
- Nisiotou A. A., Chorianopoulos N., Nychas G. J. E., Panagou E. Z. (2010). Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black *Conservolea* olives in different brine solutions. *Journal Applied Microbiology*, 108:396–405.
- NP 3034 (2012) Norma Portuguesa: Azeitonas de mesa. Definição, classificação, características, acondicionamento e rotulagem.
- NP 1421 (1977) Norma Portuguesa: Géneros alimentícios derivados de frutos e de produtos hortícolas. Determinação da acidez.
- NP-1422 (1977) Norma Portuguesa: Géneros alimentícios derivados de frutos e de produtos hortícolas. Determinação do teor de cloretos.
- Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z., Parker, M. L., Waldron, K. W., Tassou, C. C. (2002) Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Letters in Applied Microbiology*, 34: 173-177.
- O'Flaherty, S. e Klaenhammer, T.R. (2010) The role and potential of probiotic bacteria in the gut and the communication between gut microflora and gut/host. *International Dairy Journal*, 20: 262-268.
- Obadina, A.O., Oyewole, O.B., Sanni, L.O., Tomlins, K.I. (2006) Bio-preservative activities of *Lactobacillus plantarum* strains in fermenting Cassava 'fufu'. *African Journal of Biotechnology*, 5: 620–623.
- Oliveira, M., Brito, D., Catulo, L., Leitão, F., Gomes, L., Silva, S., Vilas Boas, L., Peito, A., Fernandes, I., Gordo, F., e Peres, C. (2004) Biotecnologia de la fermentacion de aceitunas de la variedad portuguesa Galega. *Grasas y Aceites*, 55:219-226.
- Ouweland, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C., Salminen, S. (1999) Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal* 9:43-52.
- Palencia, P., López, P., Corbí, A. L., Peláez C., Requena, T. (2008) Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, *in vitro* adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *European Food Research and Technology* 227: 1475–1477.
- Panagou, E. Z. (2004). Effect of different packing treatments on the microbiological and physicochemical characteristics of untreated green olives of the *Conservolea* cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84:757–764.
- Panagou, E. Z., Hondrodinou, O., Mallouchos, A., Nychas, G.-J.E. (2011) A study on the implications of NaCl reduction in the fermentation profile of *Conservolea* natural black olives. *Food Microbiology*, 28: 1301-1307.
- Panagou, E. Z., Schillingerb, U., Franz, C.M.A.P., Nychas, G.-J. E. (2008) Microbiological and biochemical profile of Cv. *Conservolea* naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 25: 348-358.
- Parinos, C. S., Stalikas, C.D., Giannopoulos, T. S., Pilidis, G.A. (2007) Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing. *Journal of Hazardous Materials*, 145: 339-343.
- Paulino E.M.G. (1997). Contribuição para a caracterização de um processo de fabrico industrial de azeitona de mesa - variedade Galega. Relatório final do Curso de Estudos Superiores Especializados em Engenharia de Produção de Óleos Alimentares. Escola Superior Agrária. Instituto Politécnico de Castelo Branco.
- Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P. and Bellon-Fontaine, M.N. (1997) Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1725–1731.



- Pereira, J. A., Pereira, A.P., Ferreira, I.C.F.R., Valentão, P., Andrade, P., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A. (2006) Phenolics compounds, antioxidant potential and microbial activity of table olives from Portugal. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54: 8425-8431.
- Peres, M. C., Peres, C., Hernández-Mendoza, A., Malcata, F. X. (2012) Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria with an emphasis on table olives. *Trends in Food Science & Technology*, 26: 31-42.
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M. (2010) Use of *Lactobacillus plantarum* and Glucose to Control the Fermentation of "Bella di Cerignola" Table Olives, a Traditional Variety of Apulian Region (Southern Italy). *Journal of Food Science*. 75: 430-436.
- Pintado, C., Peres, F., Peres, C. (2006) Perfis microbiológico e químico da fermentação de azeitona tipo verde estilo sevilhano da cultivar "Azeitona" ou "Azeitoneira" em duas datas de colheita. *Melhoramento*, 41:252-260.
- Potes, M. E., Marinho, A. A. (2007) Utilização de diferentes meios de cultura na identificação e recuperação de bactérias lácticas. *Revista Portuguesa Ciências Veterinárias*, 102: 145-151
- Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., Soccol, C. R. (2008) Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41: 111-123.
- Ray, B. (2001) *Fundamental Food Microbiology*, CRS Press, Washington.
- Reid, G. (2005). The importance of guidelines in the development and application of probiotics. *Current Pharmaceutical Design*, 11: 11–16.
- Rejano, L., Montañó, A., Casado, F. J., Sánchez, A. H., Castro, A. (2010) Table Olives: Varieties and Variations. Food Biotechnology Department, Instituto de la Grasa CSIC, Seville (Spain), 1, 5-15.
- Rivera-Espinoza, Y. e Gallardo-Navarro, Y. (2010) Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27: 1-11.
- Rizk, C., Valdes, L., Ogier, B. H., Saudubray, J. M., Olivier, C. (1999) Severe lactic acidosis disease disclosing milk-protein intolerance to cow's milk. *Archives de pédiatrie: organe officiel de la Société française de pédiatrie*, 6 (4): 427-429.
- Rodríguez-Gómez, F., Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Romero-Gil, V., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., García-García, P. (2013) Table olive fermentation with multifunctional *Lactobacillus pentosus* strains. *Food Control*, 34:96-105.
- Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., Garcia, P., Garcia, A., Garrido, A. (2004) Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 479-484.
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Nevado, F.P., Córdoba, M. G. (2008) Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science* 80: 715-721.
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Nevado, F.P., Córdoba, M. G. (2008) Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*, 80: 715-721.
- Saad, S.M.I., Cruz, A.G., Faria, J.A.F. (2011) Probióticos e prébióticos em alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas, 1.ª edição, Livraria Varela.
- Saarela, M., Lähteenmäki, L., Crittenden, R., Salminen, S., Mattila-Sandholm, T., (2002) Gut bacteria and health foods – the European perspective. *International Journal of Food Microbiology* 78: 99–117.
- Sabatini, N., Mucciarella, M. R., Marsilio, V. (2008) Volatile compounds in uninoculated and inoculated table olives with *Lactobacillus plantarum* (*Olea europaea* L., cv. *Moresca* and *Kalamata*). *Lwt-Food Science and Technology*, 41: 2017-2022.
- Salminen, M. K., Rautelin, H., Tynkkynen, S., Poussa, T., Saxelin, M., Valtonen, V., Jarvinen, A. (2004). *Lactobacillus* Bacteremia, Clinical Significance, and Patient Outcome, with Special Focus on Probiotic *L. Rhamnosus* GG. *Clinical Infectious Diseases*, 38:62–9.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.-C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.F.R., Isolauri, E., Moreau, M.-C., Roberfroid, M., Rowland, I. (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition* 80 (1): S147–S171.
- Sánchez AH, Rejano L, Montañó A, de Castro A. (2001) Utilization at high pH of starter cultures of lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation. *International Journal Food Microbiology*, 67: 115-122.
- Sánchez, A. H., de Castro, A., Rejano, L., Montañó, A. (2000) Comparative study on chemical changes in olive juice and brine during green olive fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5975-598.
- Sánchez, A. H.; de Castro, A.; Rejano, L.; Montañó, A. (2000) Comparative study on chemical changes in olive juice and brine during green olive fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5975-598.

- Sanders, M.E.; Gibson, G.; Gill, H.S.; Guarner, F. (2007) Probiotics: their potential to impact human health. *CAST issue paper* No. 36.
- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., de Vos, W. M. (2005). Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion Biotechnology* 16: 204–211.
- Schillinger, U., Guigas, C., Holzapfel, W.H. (2005). *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, 12: 1289–1297.
- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28: 405–440.
- Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., Mentis, A. (2004) *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Applied Environmental Microbiology*, 70: 518-526.
- Silva, T., Reto, M., Sol, M., Peito, A., Peres, C.M., Peres, C., Malcata, F.X. (2011) Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. *Lwt-Food Science and Technology*, 44: 1349-1354.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., Lugasi, A. (2008) Functional food. Product development marketing and consumer acceptance – A review. *Appetite*, 51 (3): 456-467.
- Sisto, A., Lavermicocca, P. (2012) Suitability of a probiotic *Lactobacillus paracasei* strain as a starter culture in olive fermentation and development of the innovative patented product “probiotic table olives”. *Frontiers in Microbiology*, 3: 174.
- Skandamis, P., Nychas, G.-J. E. (2000) Development and validation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in home-made eggplant under various temperatures, pH and oregano essential oil concentrations. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 1646-1653.
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., Wichers, H. J. (2000) Review - Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1013-1023
- Spyropoulou, K. E., Chorianopoulos, N. G., Skandamis, P. N., Nychas, G.-J. E. (2001) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation of Spanish-style green table olives (*Conservolea* variety) supplemented with different carbon sources. *International Journal of Food Microbiology*, 66:3-11.
- Sriphochanart, W., Skolpap, W. (2010) Characterization of proteolytic effect of lactic acid bacteria starter cultures on Thai fermented sausages. *Food Biotechnology*, 24: 293–331.
- Stiles, M.E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70: 331-345.
- Svec, P., Drab, V., Sedlacek, I. (2005). Ribotyping of *Lactobacillus casei* group strains isolated from dairy products. *Folia Microbiologica*, 50: 223–228.
- Taheri, H., Tabandeh, F., Moravej, H., Zaghari, M., Shivazad, M., Shariati, P. (2009) Potential probiotic of *Lactobacillus johnsonii* LT171 for chicken nutrition. *African Journal of Biotechnology*, 8: 5833–5837.
- Todorov, S.D., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M.B., Holzapfel, W. H., Dicks, L.M.T., (2008) Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 104: 465–477.
- Tofalo, R., Schirone, M., Perpetuini, G., Angelozzi, G., Suzzi, G., Corsetti, A. (2012) Microbiological and chemical profiles of naturally fermented table olives and brines from different Italian cultivars. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102:121-123.
- Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F. (2001) Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology* 67:3450-3454.
- Turner, J.L., Dritz, S.S., Minton, J.E. (2001). Review: alternatives to conventional antimicrobials in swine diets. *Prof. Anim. Sci.* 17: 217-226.
- Valerio, F., De Bellis, P., Lonigro, S. L., Morelli, L., Visconti, A., Lavermicocca, P. (2006) *In vitro* and *in vivo* survival and transit tolerance of potentially probiotic strains carried by artichokes in the gastrointestinal tract. *Applied Environmental Microbiology*, 72: 3042–3045.
- Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T., Chikindas, M.L. (1998). Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 84:1131–1137.
- Vesterlund, S., Vankerckhoven, V., Saxelin, M., Goossens, H., Salminen, S., Ouwehand, A.C. (2007). Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *International Journal Food Microbiology*, 116:325–331.

- Vinderola, C.G., Bailo, N., Reinheimer, J.A.(2000) Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33:97–102.
- Wadstrom F., Andersson K., Sydow M., Axelsson L., Lindgren S., Gullmar B. (1987). Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *Journal Applied Bacteriology*, 62: 513-520.
- Walker, G. M. (1998) *Yeast-Physiology and Biotechnology*. J. Wiley & Sons, New York.
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3: 163–175.
- Wood, B. J. B., ed. (1998) *Microbiology of Fermented Foods*, Vol. 1. *Blackie Academic & Professional*, Glasgow.
- Yoon K.Y., Woodams E. E., Hang Y.D. (2004) Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiology*, 42(4): 315-318.
- Zhou, J.S., Gopal, P.K., Hill, H.S. (2001) Potential probiotic lactic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin in vitro. *International Journal of Food Microbiology*, 63: 81–90.

## **ANEXO**

**FOLHA DE PROVA DE AZEITONA DE MESA**  
(COI/OT/MO Doc. No. 1, 2008, Rev. 2010)



**PERCEÇÃO DAS SENSações GUSTATIVAS**

	Nenhum	Muito
Salgado	_____	_____
Amargo	_____	_____
Ácido	_____	_____

**PERCEÇÃO DAS SENSações QUINESTÉSICAS**

Firmeza (dureza)	_____
Fibrosidade	_____
Crocante	_____

Comentário (sobre a percepção das sensações gustativas e quinestésicas):

Código da amostra:

Nome do provador:

Data:

**FOLHA DE PROVA DE AZEITONA DE MESA**  
(COI/OT/MO Doc. No. 1, 2008, Rev. 2010)



**PERCEPÇÃO DAS SENSações GUSTATIVAS**

	Nenhum	Muito
Salgado	-----	
Amargo	-----	
Ácido	-----	

**PERCEPÇÃO DAS SENSações QUINESTÉSICAS**

Firmeza (dureza)	-----
Fibrosidade	-----
Crocante	-----

Comentário (sobre a percepção das sensações gustativas e quinestésicas):

Intenção de compra	-----
--------------------	-------

Código da amostra:

Nome do provador:

Data: